

**EEN ONDERZOEK NAAR HET NIET AAN TRANSFERRINE GEBONDEN
IJZER IN PLASMA**

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE
AAN DE MEDISCHE FACULTEIT TE ROTTERDAM,
OP GEZAG VAN DE DEKAAN PROF.DR.J.MOLL
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE,
TEGEN BEDENKINGEN VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN
UIT DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE
TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 17 NOVEMBER TE 16.00 PRECIES**

DOOR

PIETER TAVENIER

geboren te Katwijk in 1941

**DRUK: V.R.B.OFFSETDRUKKERIJ – KLEINE DER A 4,
GRONINGEN**

PROMOTOR: PROF.Dr. B.LEIJNSE
COREFERENTEN: Dr. H.G.VAN EIJK,
PROF.Dr. J.B.J.SOONS.

*Aan Grietje
Roosmarijne
Pieter Matthijs*

INHOUD.

HOOFDSTUK I.	7
Inleiding.	
Literatuuroverzicht.	
Probleemstelling	
HOOFDSTUK II.	13
Materialen en methoden.	
HOOFDSTUK III.	23
Karakterisering van het systeem: ijzer-ascorbinezuur in 0,05 molair fosfaat pH 7,4.	
HOOFDSTUK IV.	47
De bestudering van het ijzer - transferrine systeem in vitro.	
HOOFDSTUK V.	69
In vivo dialyse experimenten bij konijnen.	
HOOFDSTUK VI.	77
Discussie.	
SAMENVATTING.	83
SUMMARY.	86
LITERATUURLIJST.	88

HOOFDSTUK I.

LITERATUUROVERZICHT EN PROBLEEMSTELLING

Het verband tussen het ijzerbindend vermogen van plasma en het ijzertransport is van het begin af aan onderkend. De naam transferrine, door Holmberg en Laurell (1) voor het ijzerbindend β -globuline in 1947 geïntroduceerd, waarin de transportfunctie tot uiting is gebracht, heeft dan ook algemeen ingang gevonden. In het bijzonder door onderzoekingen met radioactieve isotopen is het mogelijk gebleken kwantitatieve gegevens betreffende de dynamische aspecten van het ijzertransport bij de mens te verkrijgen.

Per dag wordt via het plasma 0,5 mmol Fe getransporteerd (2), de concentratie aan transferrine in plasma is 30 $\mu\text{mol/l}$, d.w.z. in totaal 90 μmol . De verzadigingsgraad van dit transferrine met Fe is 30%, d.w.z. er is een Fe-concentratie van 20 $\mu\text{mol/l}$, in totaal 60 μmol . Het ijzer in plasma wordt dus per dag zeker acht keer vernieuwd. Dat een transferrinemolecuul vele malen gebruikt kan worden voor het transporteren van ijzeratomen, blijkt uit het feit dat de halfwaardetijd van het Fe in serum 90 minuten bedraagt, tegenover de halfwaardetijd van het transferrine van circa 10 dagen.

Sedert de ontdekking van transferrine - waarbij de naam Schade (3), die de stof in 1945 de naam siderophiline gaf, genoemd moet worden - is zeer veel onderzoek over dit eiwit verricht. Er moet opgemerkt worden dat onze kennis toch zeer onvolledig is. Glaser (4) gaf in 1970 in zijn dissertatie "Onderzoekingen omtrent het ijzer-transferrine systeem" een uitgebreid literatuuroverzicht, waarin genoemd manco duidelijk naar voren kwam. Met het onderzoek, beschreven in genoemde dissertatie, trachtte Glaser onze kennis op bepaalde punten te verrijken. De door hem gevonden gegevens maken het mogelijk bepaalde vraagstellingen nauwkeuriger te formuleren. Uiteraard zal in het navolgende niet meer uitgebreid op de gegevens uit de literatuur, die door Glaser zijn behandeld, worden ingegaan. Slechts die punten uit de literatuur zullen worden besproken, welke van principieel belang zijn voor onze proefopzet.

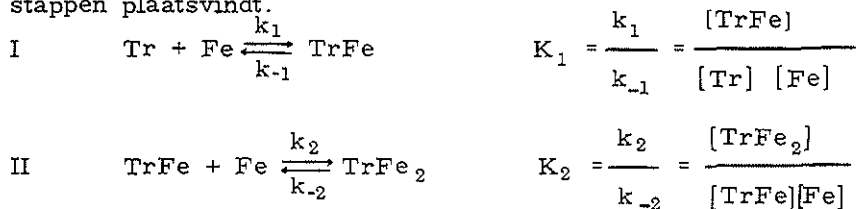
Reeds kort nadat de rol van transferrine in het ijzertransport was aangetoond, werd een vraag gesteld aangaande het mechanisme waar heden ten dage nog geen definitief antwoord op bestaat. Flexner, Vosburg en Cowie (5) veronderstelden in

1948 dat de capillairwanden doorgankelijk zouden zijn voor transferrine. Indien deze veronderstelling juist is, zou de ijzeroverdracht van transferrine naar het haemsynthetiserende systeem benevens van en naar ferritine plaats kunnen vinden door direct contact tussen transferrine en ijzertransferrine en de betreffende cellen.

De visie van Laurell (6), in 1951 geformuleerd, is dat bij deze overdracht van ijzer een rol is weggelegd voor vrij ijzer, bijvoorbeeld in ionogene vorm. Hoewel er, vooral door Jandl en Katz (7), gegevens zijn verkregen die pleiten ten gunste van Flexner's opvattingen, bestaat er nog geenszins zekerheid op dit punt.

Uiteraard zal nadere kennis omtrent reactie- en evenwichtsconstanten van de reactie tussen Fe en transferrine het mogelijk maken omtrent bovengenoemde en andere problemen een uitspraak te doen.

Algemeen wordt aangenomen, dat de genoemde reactie in twee stappen plaatsvindt.



Glaser heeft in zijn eerder genoemde dissertatie een uitvoerig onderzoek naar de grootte van K_1 en K_2 gedaan. Zijn resultaten en de resultaten van de onderzoeken van Davis, Saltman en Benson (8) uit 1962 en Aasa, Malmström, Saltman en Vännngard (9) uit 1963 zijn in tabel I.1 samengevat. Teneinde onderlinge vergelijkbaarheid te verkrijgen, zijn de door Glaser, in de door hem gebruikte bovengenoemde definitie van K_1 en K_2 , omgerekende gegevens van genoemde auteurs opgegeven.

Het zal duidelijk zijn uit tabel I.1, dat er een zeer groot verschil bestaat tussen de door Glaser gevonden evenwichtsconstanten en die van Davis c.s. en Aasa c.s. Uit de K-waarden van laatstgenoemde auteurs zou moeten worden afgeleid dat van een hoeveelheid vrij ijzer, geschikt voor een transportfunctie, geen sprake kan zijn. Glaser's K-waarden doen juist een onverwachte en moeilijk te aanvaarden hoge "vrij"-ijzerconcentratie in de lichaamsvloeistoffen verwachten. De discrepantie wordt begrijpelijk wanneer de totaal verschillende omstandigheden in de verschillende series experimenten mede in de beschouwing wordt betrokken. Glaser bestudeerde de reacties I

Tabel I.1.

De door verschillende onderzoekers gevonden K_1 en K_2 waarden bij de bestudering van het evenwicht tussen Fe en transferrine.

Auteur		K_1	K_2	Bijzonderheden
*Davis e.a.		2×10^{30}	5×10^{27}	pH 7,4, EDTA aanwezig
*Aasa e.a.	I	5×10^{28}	$1,25 \times 10^{28}$	pH 9, EDTA aanwezig
	II	$3,6 \times 10^{18}$	$0,9 \times 10^{17}$	pH 6,5, citraat aanwezig
Glaser	I	$0,25 \times 10^6$	$0,5 \times 10^5$	pH 7,4, ascorbinezuur aanwezig
	II	$0,12 \times 10^6$	$0,16 \times 10^5$	pH 7,4, H_2 aanwezig

* Zie voor de omrekening van de K-waarden van Aasa en Davis de dissertatie van Glaser.

en II in een milieu waarin Fe, zoal niet voor 100% dan toch voor een groot percentage in de vorm van Fe (II) geacht werd aanwezig te zijn. Davis c.s. en Aasa c.s. deden hun onderzoekingen met Fe (III). Gezien het feit dat het oplosbaarheidsproduct van ferrihydroxide 4×10^{-38} bij 25°C (10) bedraagt, is het duidelijk dat het weinig zin heeft met Fe (III)-ionen te werken. Vandaar dat genoemde onderzoekers chelaatvormers gebruikten, EDTA of citraat, teneinde Fe (III)-concentraties van bruikbaar niveau te bereiken. Dit is natuurlijk een complicerende factor, want het is uiteraard niet zeker dat in zo'n milieu de reacties zullen verlopen als in I en II aangegeven. Volgens sommige auteurs (11) vindt de oplading van transferrine met ijzer plaats vanuit een milieu waarin ijzer in chelaatvorm aanwezig is, door reactie van transferrine moleculen met de ijzerchelaten.

Het oplosbaarheidsproduct van ferrohydroxide bedraagt bij 25°C 2×10^{-15} (12). Hieruit blijkt dat het werken met een behoorlijke concentratie Fe (II) voor de bestudering van de reacties I en II zeker mogelijk is. De moeilijkheid in dit geval is echter dat bij een fysiologische zuurgraad, pH 7,4, indien geen speciale maatregelen genomen worden, het Fe (II) zal overgaan in Fe (III). Glaser gebruikte om deze omzetting te verhinderen ascorbinezuur, een begrijpelijke keuze gezien het feit dat dit reductans in bloed voorkomt. Volgens sommige auteurs (13) echter zou Fe (II) met ascorbinezuur een complex vormen; dit zou uiteraard een complicatie vormen. Hiertegen pleit dat in de proefnemingen waarbij in plaats van ascorbinezuur langdurig doorleiden van H_2 werd gebruikt, ongeveer dezelfde K-waarden werden gevonden. Toch rijzen allerlei vragen met betrekking tot het werken met Fe (II). Er is een theorie die stelt dat slechts Fe (III) kan reageren met transferrine. Weliswaar is van oudsher bekend dat het ijzertransferrine complex zowel door toevoeging aan transferrine van Fe (II) als Fe (III)-zouten

ontstaat. Maar in het transferrine-ijzer complex dat met Fe (II) of Fe (III) ontstaat, bezit het ijzer de driewaardige vorm. Het is dus duidelijk dat wanneer dit ijzertransferrine complex met behulp van Fe (II) wordt gevormd, er een overgang tot de driewaardige toestand moet optreden. Dit kan plaatsvinden in de oplossing, dus alvorens het Fe met transferrine reageert. Het kan ook plaatsvinden nadat een Fe (II)-ion een binding met transferrine heeft aangegaan. De eerste opvatting werd door Koechlin (14) in 1952 naar voren gebracht. Ross, Kochwa en Wasseman (15) stellen zich op het tweede standpunt en wel op grond van metingen van de reactiesnelheid. De reactie tussen transferrine en Fe (III) gaat volgens deze auteurs weliswaar aanvankelijk sneller dan die tussen transferrine en Fe (II), maar gaat in het eerste geval niet verder dan 70-85% van de totale verzadiging, die in het tweede geval wordt bereikt. Bovendien heeft toevoeging van reducerende stoffen in het geval Fe (III) wordt gebruikt, geen invloed op de reactiesnelheid.

Glaser stelde vast dat de reactie tussen transferrine en Fe (II) bij de door hem gekozen omstandigheden altijd veel sneller verliep dan wanneer Fe (III) werd gebruikt. Bovendien deed toevoeging van het reductans ascorbinezuur de reactiesnelheid tussen transferrine en Fe (III) sterk toenemen. Glaser's conclusie ligt voor de hand, transferrine reageert met Fe (II). Toch blijft ook op dat punt een grote onzekerheid bestaan. Schade, Reinhart en Levie (16) stelden in 1949 vast dat voor het ontstaan van het ijzertransferrine complex met de bekende zalmkleur, absorptiemaximum 470 nm, zuurstof nodig is. Zuurstof zou echter door ascorbinezuur vervangen kunnen worden. Wel zou tussen transferrine en Fe (II) een verbinding kunnen ontstaan indien bicarbonaat aanwezig is, een verbinding die echter een geelbruine kleur zou hebben en dus sterk afwijkend zou zijn van het zalmkleurig product.

De rol van bicarbonaat bij de vorming van het ijzerascorbinezuur complex is eveneens verre van opgehelderd. Warner en medewerkers (17) meenden met ^{14}C te kunnen vaststellen dat per atoom Fe een molecuul HCO_3^- aan transferrine werd gekoppeld. Aanvankelijk stelden Aasa en medewerkers (18) zich in 1963 op hetzelfde standpunt, maar in 1967 liet dezelfde groep onderzoekers (19) deze opvatting varen. Bicarbonaat zou slechts een katalyserende werking hebben. Inderdaad volgt ook uit Glaser's proeven, waarbij langdurig H_2 werd doorgeleid, dat vrijwel zeker bicarbonaat niet onmisbaar is voor de vorming van ijzertransferrine. Uit Glaser's onderzoek over de reactieconstanten k_1 en k_2 blijkt niet alleen het welbekende feit dat HCO_3^- een sterk versnellende werking heeft op de reactie tussen Fe en

steem in vitro. Zoals gezegd was ons doel tevens het verrichten van in vivo experimenten en wel met konijnen. Door het uitvoeren van zowel in vitro als in vivo proeven hoopten wij tot een conclusie te kunnen komen over de vraag hoeveel niet aan transferrine gebonden ijzer onder verschillende omstandigheden aanwezig is. Dit gegeven zal het ons inziens mogelijk maken tot een conclusie te komen omtrent de strijdvraag of "vrij ijzer" een rol speelt bij het ijzertransport.

HOOFDSTUK II.

MATERIALEN EN METHODEN.

§ 1. *Transferrine.*

Humaan transferrine werd verkregen van de firma A.B.KABI (Zweden) in lyophiel gedroogde vorm. De door de firma opgegeven zuiverheid bedroeg meer dan 90%. Glaser vond met zetmeeelectrophorese en chromatografie met een DEAE cellulosekolom geen bijmengsels. Konijnttransferrine werd verkregen van de firma PENTEX eveneens in lyophiel gedroogde vorm. Door de firma werd geen zuiverheid opgegeven. Wij onderzochten van beide soorten transferrine het drooggewicht en asgehalte. Dit bleek 100% resp 4% te bedragen voor het humaan transferrine en 89% resp 6% voor het konijnttransferrine. Het konijnttransferrine bevatte 14% albumine. De voorkomende verontreiniging van albumine in het konijnttransferrine preparaat bleek niet storend, daar met konijnttransferrine slechts in vivo proeven zijn verricht onder omstandigheden waar reeds albumine aanwezig was. In vele gevallen was het nodig om zowel het humane als het konijnttransferrine ijzervrij te maken. Dit werd bereikt door de transferrineoplossing tweemaal 24 uur te dialyseren tegen 0,05 mol/l azijnzuur-acetaatbuffer pH 5,0 waarin EDTA met een concentratie van 0,02 mol/l aanwezig was. Vervolgens werd 24 uur gedialyseerd tegen aqua bidest. Tenslotte werd de eiwitoplossing op pH 7,4 gebracht door twee maal 24 uur te dialyseren tegen een fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4. Bij deze dialyse werd het transferrine tevens gezuiverd van bovenvermelde anorganische bijmengsels.

§ 2. *Bepalingsmethoden voor transferrine.*

Het transferrine gehalte van oplossingen die één van de twee bovengenoemde preparaten bevatten, werd door ons op twee manieren nagegaan:

- A) Met de radiale immuno-diffusie techniek ontwikkeld door Mancini en Heremans (21). We gebruikten hierbij transferrine-partiëen-immuno-diffusie-platen van de firma Hoechst Behringwerke. Als standaardoplossing werd een gestabiliseerd humaan serum gebruikt, dat eveneens door Behringwerke werd geleverd.
- B) Door middel van de ijzerbindingscapaciteitsbepaling met be-

hulp van metingen bij 470 nm. Voor de molaire extinctiecoëfficiënt werd door Glaser $5,2 \times 10^3$ gevonden. Laatstgenoemde waarde stemt zeer goed overeen met de in de literatuur door Surgenor (22) en Leibman (23) opgegeven waarden van $5,1 \times 10^3$ resp. $5,1 \times 10^3$. Deze bepaling van het transferrine gehalte vond als volgt plaats: Aan 1,00 ml fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4 werd 0,03 ml ascorbinezuur (conc. 85 mmol/l) en 0,02 ml natriumbicarbonaat (1 mol/l) toegevoegd. Er werd altijd ongeveer 0,05 μ mol transferrine gebruikt. Afhankelijk van de transferrine concentratie, die wisselde van 0,5 tot 1,0 mmol/l werd dus 0,1 tot 0,05 ml gebruikt. Aan bovenstaand reactiemengsel werd uiteindelijk de vereiste hoeveelheid Fe (II) oplossing (conc. 2,0 mmol/l) toegevoegd waarbij de hoeveelheid ijzer ongeveer twee maal zo groot was dan maximaal aan het transferrine gebonden kon worden. Na een incubatieperiode van 2 uur werd de extinctie bij 470 nm gemeten. Uit de gemeten extinctie werd door middel van de molaire extinctiecoëfficiënt de transferrine concentratie berekend.

De overeenkomst tussen de radiale immuno-diffusie techniek en de door middel van de ijzerbindingscapaciteit bepaalde transferrine concentratie bleek zeer goed te zijn. In de meeste gevallen was het verschil dat tussen beide methoden werd gevonden kleiner dan 4%.

§ 3. *Bepalingsmethoden voor ijzer.*

A) De bepaling van het totaal aanwezige Fe in een oplossing, die zowel Fe (II), Fe (III) als Fe gebonden aan ascorbinezuur of transferrine bevatte, vond plaats met de methode van Trinder (24).

B) Een bepaling van de Fe (II) ionen concentratie bij pH 7,4 werd uitgewerkt. Evenals bij de methode van Trinder kozen we voor het kleurreegens bathophenanthrolinedisulfonzuur. Dit chromogeen reageert slechts met Fe (II) tot een gekleurd complex, dat bij 525 nm een absorptiemaximum bezit. Teneinde een goede bepalingmethode van de Fe (II) concentratie te hebben, moet aan twee voorwaarden zijn voldaan. Ten eerste moet de molaire extinctie coëfficiënt bekend zijn. Ten tweede moet de meting van de extinctie bij 525 nm een maat zijn voor de Fe (II) ionen concentratie, dit wil zeggen er mag geen al te snelle vorming van Fe (II) uit Fe (III) of aan andere stoffen gebonden Fe plaatsvinden. In de eerste plaats gingen we na of de molaire extinctiecoëfficiënt van het Fe (II) chromogeen bij pH 7,4 verschilt van die bij de door Trinder gebruikte pH van 4,5. Dit

werd als volgt nagegaan: Aan 1,00 ml fosfaatbuffer (conc. 0,05 mol/l) pH 7,4 werd 0,03 ml ascorbinezuur (conc. 85 mmol/l), 0,50 ml bathophenantrolinedisulfonzuur (conc. 0,5 mmol/l) en 0,02 ml Fe (II) oplossing (conc. 2,0 mmol/l) toegevoegd. Op verschillende tijdstippen na de Fe (II) toevoeging werd de extinctie bij 525 nm van hetzelfde mengsel gemeten. Op volledig identieke wijze werd de proef herhaald maar i.p.v. fosfaatbuffer werd nu een azijnzuur-acetaatbuffer (conc. 4 mol/l) pH 4,5 gebruikt. Ook nu werd de extinctie op verschillende tijdstippen gemeten. Tabel II.1. geeft een overzicht van de resultaten.

Tabel II.1.

De snelheid van het ontstaan van het Fe-Bathophenantroline complex bij
pH 7,4 en bij pH 4,5

Tijd (min)	$E_{(525\text{ nm})}$ fosfaatbuffer (pH 7,4)	$E_{(525\text{ nm})}$ azijnzuur-acetaatbuffer (pH 4,5)
1	0,528	0,535
5	0,528	0,538
10	0,526	0,538
15	0,526	0,538
20	0,526	0,538
25	0,528	0,537
30	0,528	0,537

Uit bovenstaande gegevens is af te leiden, dat de extinctie, die ontstaat wanneer Fe (II) aan het chromogeen wordt toegevoegd, binnen 1 minuut maximaal is en dat er geen essentieel verschil tussen de molaire extinctiecoëfficiënten bestaat bij pH 7,4 resp pH 4,5.

We onderzochten de kleurontwikkeling bij pH 7,4 na toevoeging van het chromogeen aan een oplossing waarin zowel Fe (II) als Fe (III) aanwezig was. Er ontstond direct een kleurontwikkeling, die daarna langzaam toenam totdat na vele uren een maximum bereikt was.

Dit verschijnsel werd door ons als volgt nagegaan: Aan 25,0 ml fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4 werd 0,25 ml ascorbinezuur (conc. 0,25 mol/l) en Fe (II) (conc. 2,0 mmol/l) toegevoegd. Het mengsel werd $1\frac{1}{2}$ uur op een schudtafel geplaatst gedurende welke tijd gedeeltelijke oxidatie van Fe (II) optrad. Na $1\frac{1}{2}$ uur werd op identieke wijze zoals reeds eerder in deze paragraaf beschreven de Fe (II) concentratie bij pH 7,4 gemeten. Fig II.1. geeft de resultaten weer.

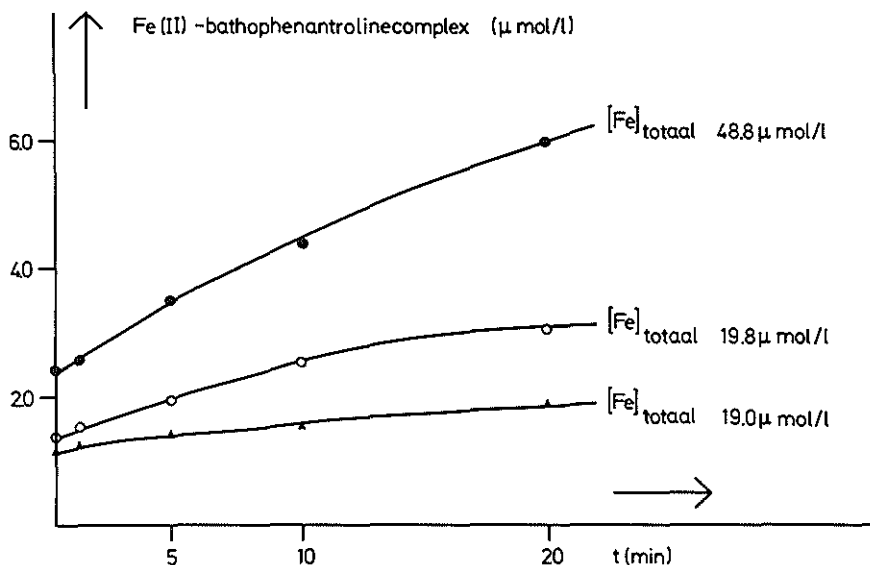


Fig II.1.

De vorming in de tijd van het Fe (II) -bathophenanthroline complex in 0,05 molair fosfaatbuffer pH 7,4 bevattende Fe (II) en Fe (III) in aanwezigheid van ascorbinezuur. Zie voor bijzonderheden de tekst.

Onze verklaring van de resultaten weergegeven in Fig II.1 is als volgt: Het aanwezige Fe (II) reageert direct met het chromogeen. Het evenwicht, dat tussen Fe (II) en Fe (III) bestaat, wordt daardoor verstoord en er vindt een voortdurende doch langzame vorming van Fe (II) uit Fe (III) plaats. Tenslotte is al het Fe aanwezig in de vorm van Fe (II) gebonden aan het chromogeen. We komen dus tot de conclusie, dat het mogelijk is om bij pH 7,4 de Fe (II) concentratie te meten ook wanneer Fe (III) aanwezig is. Hierbij moet echter aan de voorwaarde voldaan worden, dat de extinctie meting na toevoeging van het reagens binnen 1 minuut plaatsvindt.

C) Fe bepaling met behulp van een micromethode voor gehalten van 0,6 - 6,0 $\mu\text{mol/l}$.

Bij lage Fe concentraties werd de volgende door ons uitgewerkte microtechniek gebruikt. Aan 1,00 ml monster werd 0,10 ml ascorbinezuur (conc. 1 mol/l) toegevoegd. Na 15 minuten staan werd 0,10 ml bathophenanthrolinedisulfonzuur dinatriumzout (conc. 0,5 mmol/l) toegevoegd. Vervolgens werd het ge-

vormde Fe complex geëxtraheerd met 0,4 ml caprylalcohol door gedurende een halve minuut de twee lagen intensief met een schudapparaat te mengen. Na centrifugeren gedurende 5 minuten (1500 g) werd in de bovenste laag, caprylalcohol, de extinctie bij 525 nm gemeten. Voor monsters waarin eiwit aanwezig was, werd alvorens de Fe bepaling te verrichten, het eiwit verwijderd. Aan 1,00 ml werd daartoe 1,00 ml azijnzuur - acetaatbuffer (conc. 4 mol/l) pH 4,5 toegevoegd en het geheel werd gedurende 15 minuten op 100°C gehouden. Na afkoelen werd gedurende 10 minuten gecentrifugeerd (1500 g) en in de bovenstaande vloeistof werd in 1,00 ml een Fe bepaling verricht op identieke wijze zoals beschreven. Het verband tussen de gemeten extinctie en de concentratie is in fig II. 2 weergegeven.

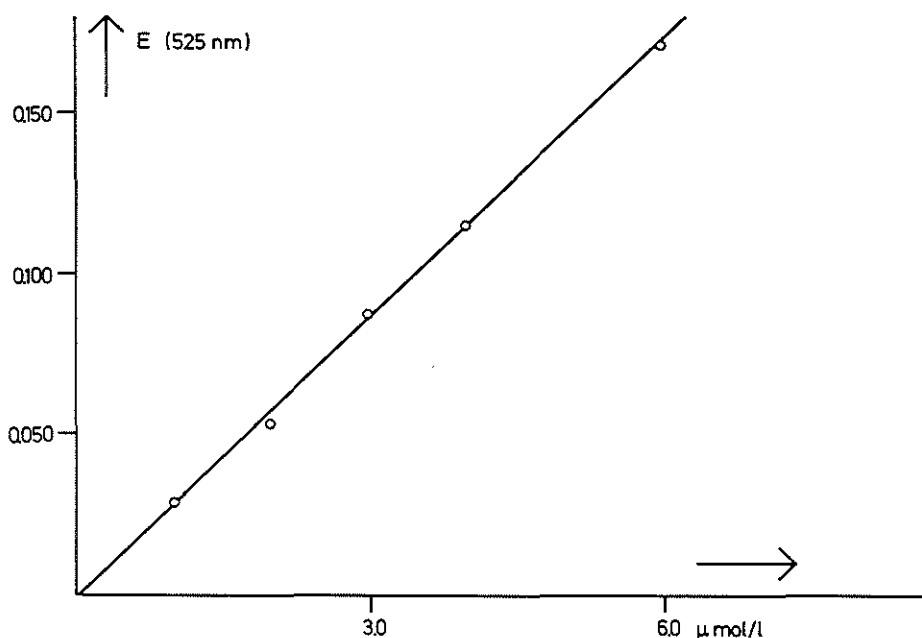


Fig II.2.

IJklijn behorende bij de micromethode voor gehalten van 0,6-6,0 μmol Fe/l.

Zie voor bijzonderheden de tekst.

De hoeveelheid Fe die met bovengenoemde methode aantoonbaar was, bedroeg 0,6 μmol/l. De standaarddeviatie bedroeg 0,05 μmol/l.

D) De ⁵⁹Fe concentratie werd gemeten met een Philips gamma teller (PW 9025 - PW 4280).

§ 4 *Bijzonderheden omtrent andere bepalingstechnieken en gebruikte materialen.*

A BEPALINGSMETHODEN VOOR ASCORBINEZUUR.

De ascorbinezuurbepaling met de redoxindicator 2,6 dichloor-phenolindophenol werd verricht volgens de methode beschreven door Henry (25). Ascorbinezuur werd ook bepaald volgens de methode van Roe (26) waarmee tevens dehydroascorbinezuur en diketogulonzuur konden worden bepaald.

B GEBRUIKTE BUFFERS.

De bij de experimenten gebruikte fosfaatbuffer (conc. 0,05 mol/l) pH 7,4 werd bereid door 6,80 g KH_2PO_4 en 35,60 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ op te lossen in 5 l aqua bidest.

De azijnzuur -acetaat buffer (conc. 4 mol/l) pH 4,5 werd bereid door 570 ml azijnzuur (conc. 4 mol/l) te mengen met 430 ml natriumacetaatoplossing (conc. 4 mol/l). De azijnzuur -acetaatbuffer (conc. 0,05 mol/l) pH 5,0 werd verkregen door 295 ml azijnzuur (conc. 4 mol/l) te mengen met 705 ml natriumacetaatoplossing (conc. 4 mol/l) en deze te verdunnen tot de gewenste concentratie van 0,05 mol/l. De pH van de bereide buffers werd gecontroleerd met een pH meter van Radiometer (type PHM 26). Indien een oplossing ^{59}Fe bevatte of een zeer klein volume had, werd met Lyphan papier gewerkt.

C EXTINCTIE METINGEN EN ABSORPTIESPECTRA.

De extinctiemetingen en absorptiespectra werden verricht met een Zeiss spectrophotometer (type PMQ II). Bij de bepaling van de extinctie bij 470 nm van het Fe-transferrine complex werden micro-kwartscuvetten gebruikt met een optische weglengte van 1 cm.

D ^{59}Fe .

Het bij de experimenten gebruikte ^{59}Fe werd verkregen als $^{59}\text{FeCl}_3$ van N.V. Philips Duphar. Het ^{59}Fe was niet dragervrij, zodat het niet radioactieve ijzer iedere keer door ons bepaald werd. De hoeveelheid niet radioactief Fe bedroeg 10-20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{C}$. Bij onze experimenten is hiermede rekening gehouden. Het ^{59}Fe werd wanneer nodig gereduceerd door aan 2 ml ^{59}Fe (100 μC) 15 mg ascorbinezuur toe te voegen, het-

geen neerkwam op een 250-voudige overmaat. De pH van het $^{59}\text{FeCl}_3$ bedroeg 2-3. Het ^{59}Fe (II) werd zonodig gemengd met ^{56}Fe (II) tot de gewenste specifieke activiteit.

E. GEBRUIKTE CHEMICALIËN.

Alle chemicaliën waren Merck p.a.. Bij het bereiden van Fe (II) oplossingen werd altijd uitgegaan van $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, voor de bereiding van Fe (III) oplossingen van $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Bij de bepaling van de totale ijzerbindingscapaciteit volgens Ramsay (27) werd gebruik gemaakt van een $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oplossing.

§ 5 *Ontwikkeling van de proefopstelling voor het werken onder omstandigheden waarbij zuurstof en CO_2 uitgesloten konden worden en de metingen van de redoxpotentiaal onder deze omstandigheden.*

De procedure, die gevolgd werd om zuurstof uit te sluiten, was als volgt: Door het reactiemengsel werd gedurende het experiment N_2 gas doorgeleid. Het N_2 gas was 99,9% zuiver. Het N_2 gas werd alvorens het door het reactiemengsel werd geleid volledig van zuurstof gezuiverd door het te leiden door een alkalische dithioniet oplossing. De alkalische dithioniet oplossing werd als volgt bereid: Aan een oplossing van 200 ml KOH (2 mol/l) werd 30 g natriumdithioniet en 30 g indigo-carmijn toegevoegd. Vers bereide oplossingen zijn geel en worden in contact met zuurstof blauw. Het N_2 gas werd geleid door 3 wasflesjes met alkalische dithioniet oplossing en door 2 wasflesjes met aqua bidest. De gasstroom werd door middel van een poreus gasfilter, wat zich aan de uitstromingsopening bevond, verdeeld in kleine gasbellen en daarna in het reactiemengsel geleid. De snelheid van gas doorleiden bedroeg 15-20 ml/min. Aanvankelijk werd de ontleding van ascorbinezuur onder anaerobe omstandigheden (zoals in hoofdstuk III paragraaf 4 weergegeven) bestudeerd met behulp van een opzet, waarbij van erlenmeyers gebruik werd gemaakt. Dit stuitte op praktische problemen vanwege de moeilijkheid om zuurstof uit te sluiten bij het nemen van monsters; bovendien was het niet mogelijk, de redoxpotentiaal in bovengenoemde opzet onder anaerobe omstandigheden te meten. Er werd door ons een reactievat geconstrueerd om bovengenoemde moeilijkheden te overkomen. Het reactievat had een volume van 150 ml en kon luchtdicht afgesloten worden met klemmen. De bovenkant was voorzien van openingen voor de elektroden en de uitstroomopening van het

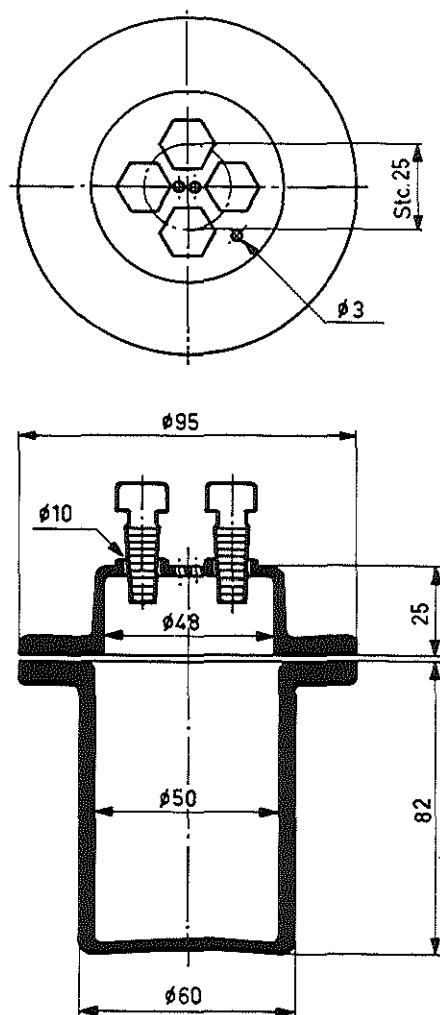


Fig II.3.

Reactievat gebruikt bij de experimenten verricht onder strikt anaerobe omstandigheden. De vier openingen kunnen afgesloten worden met stoppen en bovendien kunnen er in plaats van stoppen precies sluitende elektroden ingebracht worden. De kleinere openingen in het deksel vormen de toevoer en de afvoer van de gasstroom en bovendien biedt het de mogelijkheid tot het nemen van monsters tijdens het experiment.

N₂ gas. Bij de metingen van de redoxpotentialaal werden een calomel en een platina electrode gebruikt van Radiometer (type K 401, resp P 101). De metingen werden verricht met een pH meter van Radiometer (type PMM 26). De aflezingen van de redoxpotentialaal hadden een nauwkeurigheid van 1 mV. Uiteindelijk kwamen we tot een reactievat zoals afgebeeld is in fig.II. 3.

De redoxpotentialaal (E) werd gemeten tegen een verzadigde calomel electrode ($E_{cal} = 244 \text{ mV}$) maar werd uiteindelijk als volgt tegen waterstof berekend: (E^h)

$$E^h = E + 244$$

De tijden gedurende welke N₂ gas door het reactiemengsel werd geleid staan vermeld bij de afzonderlijke experimenten.

Bij de proeven waarbij we CO₂ uitsloten, werd eveneens de proefopstelling gebruikt weergegeven in fig II. 3. Inplaats van een alkalische dithionietoplossing werd een oplossing van KOH (2 mol/l) gebruikt en in plaats van N₂ gas werd lucht doorgeleid. Wanneer er tijdens het experiment toevoegingen plaatsvonden of monsters genomen werden, dan gebeurde dit met injectiespuiten (Braunüle Gr 1R, Braun Meisungen) via de uitstroomopening van het gas.

§ 6 *Bijzonderheden omtrent de ultrafiltratie - en dialyse opzet.*

A ULTRAFILTRATIE-EN DIALYSE OPZET VOOR IN VITRO EXPERIMENTEN.

Hiervoor zij verwezen naar de paragrafen 2 en 5 van hoofdstuk IV.

B DIALYSE-OPZET VOOR IN VIVO PROEVEN.

Hiervoor zij verwezen naar paragraaf 1 van hoofdstuk V.

Verdoving van het konijn en onstolbaar maken van het bloed bij in vivo proeven*.

Voor het verdoven van het konijn werd een dosis Hypnorm (0,02% Fentanyl, Philips Duphar) intramusculair gegeven, die overeen kwam met 0,5 ml per kg lichaamsgewicht. Soms bleek het nodig na 15 - 20 minuten na de eerste dosis nog 1 ml Hypnorm te geven.

Bloed werd onstolbaar gemaakt met 2,0 ml heparine oplossing

(thromboliquine 5000 U.I. /ml, Organon Oss). Om het bloed onstolbaar te houden werd om het half uur 0,5 ml heparine oplossing toegediend. Dit geschiedde met een zeer dunne naald, die in de slang geprikt werd, die naar de oorader liep.

*Gaarne danken wij op deze plaats Prof.Dr.M.W. van Hof, Afd.Fysiologie I Med.Fac. Rotterdam voor zijn hulp met betrekking tot onze proefopstelling.

HOOFDSTUK III.

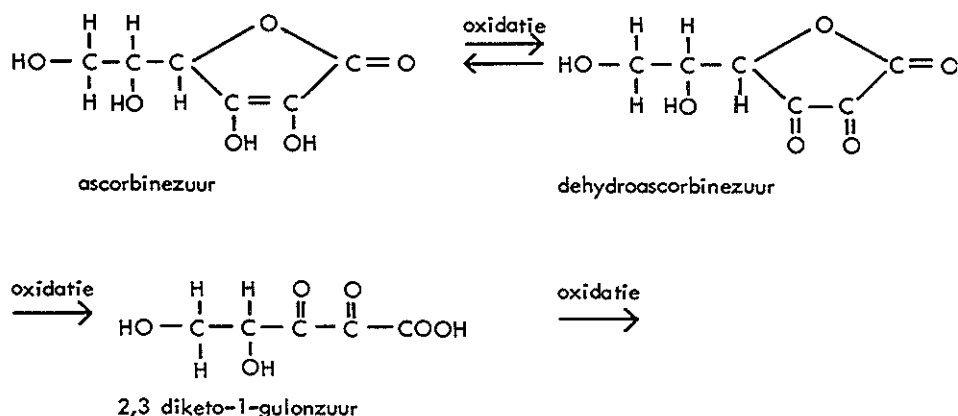
KARAKTERISERING VAN HET SYSTEEM: IJZER-ASCORBINE- ZUUR IN 0,05 MOLAIR FOSFAATBUFFER PH 7,4

Inleiding:

Eén van de bekendste chemische eigenschappen van ascorbinezuur is het reducerend vermogen. Hiervan wordt wel gebruik gemaakt om een oplossing van Fe in tweewaardige toestand te brengen en te houden. Ook op ons laboratorium is dit gedaan en wel met betrekking tot het eerder beschreven onderzoek van Glaser betreffende het Fe-transferrine systeem in vitro onder speciale omstandigheden.

Zoals in hoofdstuk I werd beschreven wilden wij van de reducerende eigenschap van het ascorbinezuur gebruik maken bij het ontwikkelen van een proefopzet bij de studie van het Fe-transferrine systeem in vitro en in vivo.

Met betrekking tot deze eigenschap bestaan er echter tot op heden vele onzekerheden. Het reducerend vermogen van ascorbinezuur brengt namelijk een weinig stabiel karakter in aeroob milieu mede. De ontstane ontledingsproducten werden reeds beschreven door Herbert in 1933 (28). De eerste oxidatiestap is de omzetting van ascorbinezuur tot dehydroascorbinezuur. Het dehydroascorbinezuur kan bij verdere oxidatie overgaan in 2,3 diketo-1-gulonzuur. Uiteindelijk kan uit het 2,3 diketo-1-gulonzuur bij verdere oxidatie het l-threoninezuur en oxaalzuur ontstaan. Onderstaand schema geeft de diverse overgangen weer:





Volgens Borsook (29) is de eerste stap, de oxidatie van ascorbinezuur tot dehydroascorbinezuur een reversibel proces. Daarentegen is de oxidatie tot het diketogulonzuur irreversibel. De derde stap is de omzetting van diketogulonzuur in l-threoninezuur en oxaalzuur. De ontleding van ascorbinezuur wordt bovendien volgens Taqui Khan (30) gekatalyseerd door metaal ionen zoals Fe (III) en Cu (II). Daarbij vermelden zij een snelheidstoename van de oxidatie van ascorbinezuur wanneer de pH stijgt.

Eén en ander maakte het voor ons noodzakelijk onze proefopstelling betreffende het Fe-ascorbinezuur systeem nader te bestuderen. De bedoeling van dit onderzoek was het Fe-ascorbinezuur systeem zodanig te karakteriseren dat de voorwaarden voor een beperking van de ontleding van ascorbinezuur zouden kunnen worden geformuleerd. Nauw daarmee samen hing de wens om een milieu te ontwikkelen waarin de valentietoestand eenduidig vastligt. In het raam van dit onderzoek meenden we tevens aandacht te moeten schenken aan enkele literatuurgegevens betreffende het bestaan van Fe-ascorbinezuur complexen.

Teneinde één en ander te bereiken deden we de navolgende series experimenten. In de eerste plaats gingen we de snelheid na van ontleding van ascorbinezuur in aeroob milieu. Vervolgens werd de invloed van ijzer op de ontleding vastgesteld. De verandering in de valentietoestand van het ijzer werd nagegaan door de kwantitatieve bepaling van de Fe (II) concentratie. Het gedrag van Fe in aanwezigheid van ascorbinezuur en haar ontledingsproducten, in het bijzonder de door ijzer met deze stoffen gevormde complexen, werd nagegaan door middel van het meten van absorptiespectra en gelfiltratie.

Eenzelfde serie proeven, maar in anaeroob milieu, werd vervolgens uitgevoerd. Te verwachten valt dat de omzetting van ascorbinezuur in dehydroascorbinezuur en van Fe (II) naar Fe (III) te beschrijven zal zijn door middel van de redoxpotential. Wij onderzochten het Fe (II) - Fe (III) en het ascorbinezuur - dehydroascorbinezuur - systeem en de combinatie van beide systemen. Dit onderzoek werd slechts in anaeroob milieu verricht, omdat het karakteriseren van het Fe (II) - Fe (III) systeem via de redoxpotential in aeroob milieu zeer moeilijk bleek te zijn. De reden hiervan is dat de aanwezigheid van zuurstof bij pH 7,4

tot een snelle oxidatie van Fe (II) naar Fe (III) leidt.

Alle proeven beschreven in hoofdstuk III zijn verricht met een 0,05 molair fosfaatbuffer pH 7,4. Dit is gedaan om zoveel mogelijk de fysiologische omstandigheden te benaderen en tevens een zo eenvoudig mogelijk systeem te hanteren. Met deze keuze continueerden wij de eerder gedane keuze door Glaser.

§ 1 *De ontleding van ascorbinezuur in aeroob milieu in aanwezigheid van ijzer in 0,05 molair fosfaatbuffer pH 7,4.*

De samenstelling van het reactiemengsel, dat een volume van 500 ml had, was als volgt: 100 μmol Fe/l, 2860 μmol ascorbinezuur/l, 154 mmol NaCl/l. Naast bovengenoemde Fe en ascorbinezuur concentraties werden concentraties van 200 μmol Fe/l en 570 μmol ascorbinezuur/l bestudeerd. Het reactiemengsel werd op de volgende wijze verkregen:

In een bekerglas van 1 liter werden uit geconcentreerde oplossingen van ascorbinezuur, Fe (II) en NaCl de vereiste hoeveelheden gepipetteerd. Daarna werd aangevuld met H_2O tot 250 ml en vervolgens werd 250 ml 0,1 molair fosfaatbuffer pH 7,4 toegevoegd. Voor het experiment met een Fe-concentratie van 100 μmol /l en een ascorbinezuurconcentratie van 2860 μmol /l werd het volgende schema toegepast:

10 ml ascorbinezuur (143 mmol/l)

7,0 ml Fe (II) (7,1 mmol/l)

50,0 ml NaCl (1540 mmol/l)

mengen en vervolgens toevoegen

192 ml H_2O

mengen en vervolgens toevoegen en mengen met

250 ml 0,1 molair fosfaatbuffer pH 7,4.

De volgorde van bijeenvoegen van de chemicalien bleek van belang te zijn. Het bijeenvoegen van ascorbinezuur, ijzer en NaCl in een andere dan bovengenoemde volgorde, deed in fosfaatbuffer pH 7,4 bij de hoogste ijzerconcentratie vaak een troebeling ontstaan. Het ontstaan van deze troebeling schreven wij toe aan de vorming van ijzer-fosfaat complexen. Het ontstaan van dergelijke colloïdale systemen van ijzer en fosfaat werd door Mushran (31) en Cole (32) beschreven. Wij stelden vast, dat bij een handelswijze als boven beschreven geen troebeling optrad. Ons inziens berust dit op het feit, dat aan de fosfaatbuffer een ijzeroplossing van slechts geringe concentratie wordt toegevoegd.

Direct nadat de oplossing in het bekerglas was bereid, werd een monster van 10,0 ml genomen teneinde het gehalte aan as-

corbinezuur, dehydroascorbinezuur en diketogulonzuur te kunnen bepalen. Het bekglas, afgedekt met parafilm, werd bij kamertemperatuur (20°C) met behulp van een schudmachine voorzichtig geschud. Na 24 uur en 48 uur werden wederom monsters genomen voor dezelfde reeks bepalingen. Tabel III.1 geeft een overzicht van de verrichte experimenten wat betreft de ijzer en ascorbinezuur concentraties.

Tabel III.1.

Ascorbinezuur- en Fe-concentraties waarbij de ontleding van ascorbinezuur onder aerobe omstandigheden gedurende 48 uur werd vervolgd.

Experiment	Ascorbinezuur ($\mu\text{mol/l}$)	Fe ($\mu\text{mol/l}$)
1	570	0
2	570	100
3	2860	0
4	2860	100
5	2860	200

De uitkomsten van de experimenten 3 en 4 zijn wat betreft de ontleding van ascorbinezuur en de daaruit ontstane ontledingsproducten weergegeven in figuur III.1.

De overige experimenten vertonen hetzelfde beeld.

Uit deze gegevens blijkt, dat Fe inderdaad de ontleding van ascorbinezuur katalyseert, hoewel de ontleding van ascorbinezuur in aerob milieu in afwezigheid van Fe reeds aanmerkelijk is. De in figuur III.1 weergegeven ontleding en de daaruit ontstane ontledingsproducten werden bepaald volgens de methode beschreven door Roe. Behalve volgens bovengenoemde methode kan de ontleding eveneens bepaald worden met een methode die gebruik maakt van een reodoxindicator zoals 2,6 dichloorphenolindophenol en beschreven wordt door Henry. Voor verdere technische details wordt verwezen naar hoofdstuk II. Figuur III. 2a* geeft de ontleding weer, gemeten met de reodoxindicator 2.6 dichloorphenolindophenol en laat zien dat, hoewel beide technieken volkomen verschillen, dezelfde resultaten worden verkregen.

Met laatstgenoemde methode kunnen de ontledingsproducten van ascorbinezuur niet bepaald worden. De methode heeft echter het grote voordeel dat de ontleding van ascorbinezuur op zeer eenvoudige wijze te meten is, dit in tegenstelling met de methode beschreven door Roe.

De lange tijd van 48 uur in de beschreven experimenten werd gekozen omdat wij naar een proefopzet streefden waarbij de

* Zie voor Fig. 2^a pag. 28

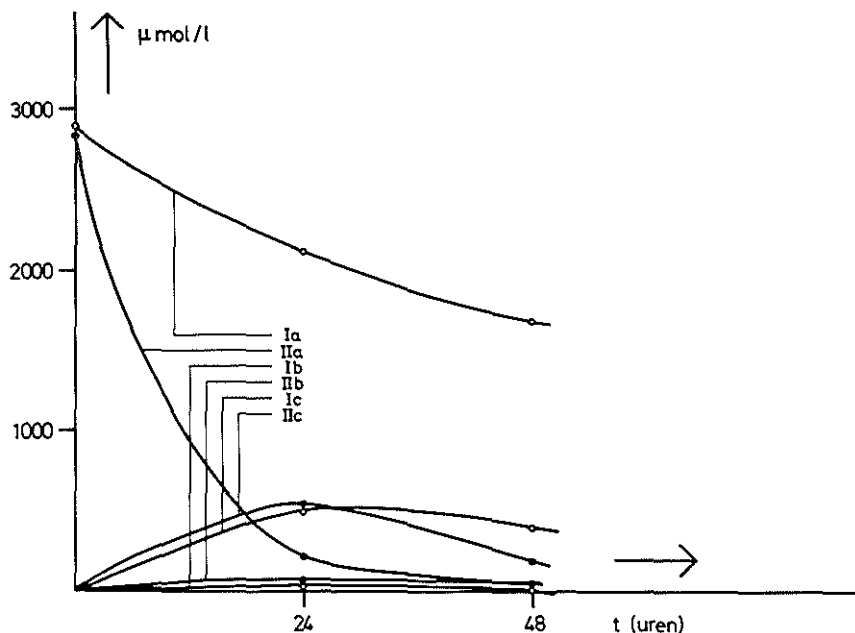


Fig III. 1.

De ontleding van ascorbinezuur over een periode van 48 uur in aeroob milieu zonder Fe toevoeging gemeten volgens de methode van Roe.

I^a) Ascorbinezuurconcentratie.

I^b) Dehydroascorbinezuurconcentratie.

I^c) Diketogulonuricconcentratie.

De ontleding van ascorbinezuur over een periode van 48 uur in aeroob milieu met Fe toevoeging (100 μmol/l) gemeten volgens de methode van Roe.

II^a) Ascorbinezuurconcentratie.

II^b) Dehydroascorbinezuurconcentratie.

II^c) Diketogulonuricconcentratie.

dialyse minimaal 48 uur zou bedragen. Gezien de uitslag van de voorgaande experimenten lag het voor de hand na te gaan of de ontleding van het ascorbinezuur beperkt kon worden door de tijdsduur te verkorten en de ijzerconcentratie te verlagen.

De experimenten zijn op identieke wijze verricht zoals reeds eerder besproken in deze paragraaf. Tabel III. 2* geeft een overzicht weer van de experimenten.

* Zie voor Tabel III. 2 pag. 29

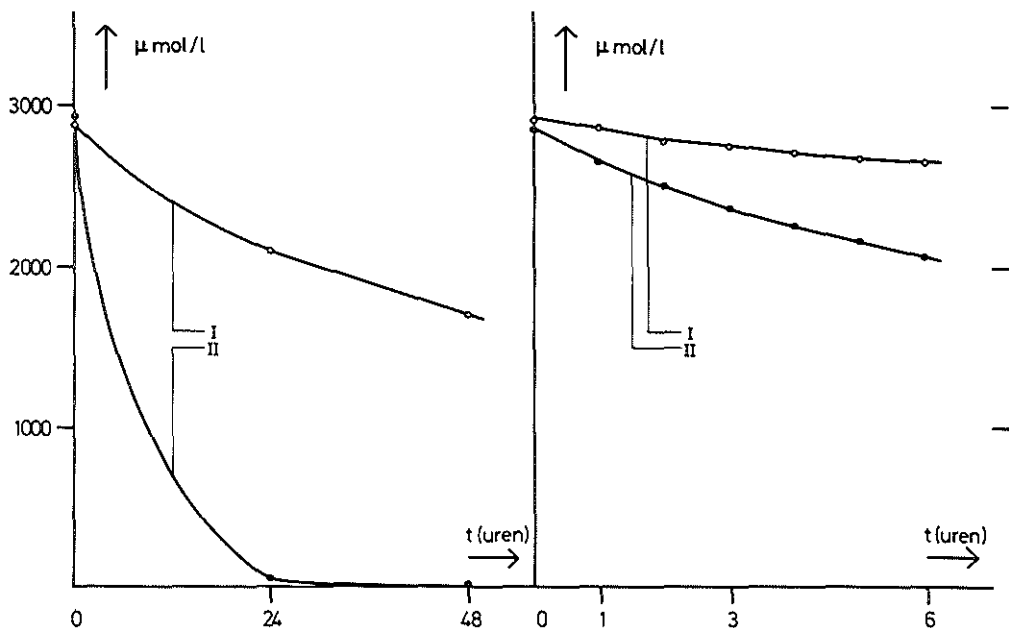


Fig III, 2^A.

De ontleding van ascorbinezuur over een periode van 48 uur in aeroob milieu gemeten met de redoxindicator 2,6 dichloorphenolindophenol.

- I) De ontleding van ascorbinezuur zonder toevoeging van Fe.
- II) De ontleding van ascorbinezuur met toevoeging van Fe (100 $\mu\text{mol/l}$).

Fig III, 2^B.

De ontleding van ascorbinezuur over een periode van 6 uur in aeroob milieu gemeten met de redoxindicator 2,6 dichloorphenolindophenol.

- I) De ontleding van ascorbinezuur zonder Fe toevoeging.
- II) De ontleding van ascorbinezuur met Fe toevoeging (100 μmol).

De tijdsduur bedroeg hier 6 uur.

De ontleding van ascorbinezuur wordt voor de experimenten 3 en 4 weergegeven in figuur III.2B.

De overige experimenten vertonen hetzelfde beeld; waarbij de ontleding bij de experimenten 1 en 3 door de afwezigheid van Fe minder bedraagt dan bij de overige experimenten. De ontleding van ascorbinezuur in 6 uur is beduidend lager dan in 24 en 48 uur in deze proeven.

Tabel III.2.

Ascorbinezuur²⁻ en Fe-concentraties waarbij de ontleding van ascorbinezuur onder aerobe omstandigheden gedurende een periode van 6 uur werd vervolgd.

Experiment	Ascorbinezuur ($\mu\text{mol/l}$)	Fe ($\mu\text{mol/l}$)
1	570	0
2	570	500
3	2860	0
4	2860	100

§ 2 *Het Fe (II) \rightleftharpoons Fe (III) evenwicht onder aerobe omstandigheden in aanwezigheid van ascorbinezuur en natriumsulfiet.*

Het probleem in hoeverre ascorbinezuur onder aerobe omstandigheden het Fe (II) ion in gereduceerde toestand kan houden bij pH 7,4 werd nader bestudeerd. Uit voorlopige proeven leidden wij af dat het eveneens nuttig zou zijn om enige experimenten met een ander reducerend middel dan ascorbinezuur te verrichten. Wij kozen daartoe natriumsulfiet.

Vele bestaande ijzerbepalingen berusten op de specifieke reactie tussen het Fe (II) ion en een chromogeen en worden verricht bij een pH van ongeveer 4,5. Bij die pH kan echter een aanwezige reductor zoals ascorbinezuur of natriumsulfiet het eventuele Fe (III) volledig reduceren. Daarmee is de mogelijkheid uitgesloten om op de gebruikelijke wijze de eventuele Fe (II) concentraties bij pH 7,4 te bepalen. Daarom werd door ons een methode uitgewerkt om de Fe (II) concentratie bij pH 7,4 te bepalen. Eén en ander is nader beschreven in hoofdstuk II, paragraaf 3.

Nadat we in staat waren de Fe (II) concentratie bij pH 7,4 te meten, is het reducerend vermogen van natriumsulfiet onder aerobe omstandigheden als volgt nagegaan: Aan 50 ml fosfaatbuffer concentratie 0,05 mol/l (pH 7,4) werd natriumsulfiet toegevoegd tot eindconcentratie van 8 mmol/l. Vervolgens werd de benodigde hoeveelheid Fe (II) vanuit een standaardoplossing in het vat gepipetteerd. Daarna werden de erlenmeyers op een schudmachine geplaatst en gedurende $1\frac{1}{2}$ uur geschud. Na $1\frac{1}{2}$ uur werd de Fe (II) concentratie bepaald.

Eveneens werd het reducerend vermogen van ascorbinezuur op Fe bij pH 7,4 nagegaan. De experimenten werden op gelijke wijze uitgevoerd, zoals beschreven bij het onderzoek naar het

reducerend vermogen van natriumsulfiet. In plaats van natriumsulfiet werd ascorbinezuur met een eindconcentratie van 2,8 mmol/l en 5,6 mmol/l genomen. Tabel III.3 geeft de op bovengenoemde wijze bepaalde Fe (II) concentratie weer in de diverse milieus.

Tabel III.3.

De Fe (II) -concentratie onder aerobe omstandigheden in aanwezigheid van natriumsulfiet of ascorbinezuur.

Fe (II) ($\mu\text{mol/l}$)		Natriumsulfiet (mmol/l)
Toegevoegd	Aanwezig	
10,0	0,3	8,0
19,8	0,2	8,0
48,8	0,2	8,0
76,0	0,2	8,0
95,2	0,2	8,0
48,8	0,2	—
		Ascorbinezuur (mmol/l)
9,9	1,2	2,8
19,6	1,6	2,8
48,6	2,6	2,8
76,8	3,4	2,8
95,1	4,4	2,8
19,8	2,6	5,6
48,9	3,7	5,6
75,8	5,1	5,6
48,6	0,2	—

Uit de gegevens, vermeld in Tabel III.3, blijkt duidelijk dat zowel ascorbinezuur als natriumsulfiet niet in staat zijn een Fe (II) oplossing onder aerobe voorwaarden bij pH 7,4 volledig in gereduceerde toestand te houden. Vastgesteld moet worden dat ascorbinezuur voor onze proefopzet de voorkeur verdient boven natriumsulfiet. In de eerste plaats is de redoxpotentiaal van het ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur gunstiger en in de tweede plaats betreft het een stof die in fysiologische omstandigheden ook aanwezig is.

§ 3 De vorming van complexen van Fe met Ascorbinezuur.

Volgens Anelli (13b) en Conrad en Schade (13a) vormt het ijzer met ascorbinezuur complexen, die een karakteristiek ab-

sorptiespectrum vertonen en een violette kleur bezitten. Laatstgenoemde auteurs onderzochten de reactie van zowel FeCl_2 als FeCl_3 met ascorbinezuur. De reactie van FeCl_2 met ascorbinezuur zou verschillen van die van FeCl_3 met ascorbinezuur. In beide bovengenoemde gevallen werd de reactie tussen ijzer en ascorbinezuur door toevoegen van NaOH van een pH 2 tot een pH van ongeveer 11 vervolgd. Uitgaande van FeCl_3 en ascorbinezuur zou er een complex gevormd worden, dat oplosbaar is over een pH gebied van 2 tot 11. Het complex, gevormd uit FeCl_2 en ascorbinezuur zou slechts oplosbaar zijn over een pH gebied van 2 tot 8. Bij een pH groter dan 8 zou het FeCl_2 in aanwezigheid van ascorbinezuur precipiteren, zodat bij een pH groter dan 9 er geen ijzer meer in oplossing is. De violette kleur, die ontstaat zowel bij de reactie tussen FeCl_2 met ascorbinezuur en FeCl_3 met ascorbinezuur zou maximaal zijn tussen pH 7 en 8. Het absorptiespectrum van beide bovengenoemde oplossingen zou een absorptiemaximum vertonen bij 540 nm. Conrad en Schade precipiteerden de bij pH 7 gevormde complexen door middel van ethanol en stelde daarna met behulp van infraroodspectrophotometrie en elementairanalyse vast, dat er verschillen aantoonbaar waren tussen het uit FeCl_3 en ascorbinezuur ontstane complex en het uit FeCl_2 en ascorbinezuur ontstane complex. Door middel van gelfiltratie met behulp van Sephadex kwamen bovengenoemde auteurs tot de conclusie, dat het percentage van het FeCl_3 -ascorbinezuurcomplex (pH 7,5) met een molecuulmassa groter dan 4000 ongeveer 25% bedroeg. Het percentage van het FeCl_2 -ascorbinezuurcomplex (pH 7,5) met een molecuulmassa groter dan 4000 zou 16% bedragen. Conrad en Schade verrichtten bovengenoemde experimenten in aeroob milieu.

Tegen de opvatting van bovengenoemde auteurs meenden wij het volgende te moeten aanvoeren. Indien men de reactie tussen zowel Fe (II) en ascorbinezuur in alkalisch milieu wil bestuderen, dient men rekening te houden met oxidatieproblemen. Teneinde de complexen tussen FeCl_2 en FeCl_3 met ascorbinezuur in zowel zuur als alkalisch milieu te onderzoeken, werden daarom door ons zowel in aeroob als anaeroob milieu experimenten verricht. De waarnemingen door Anelli gedaan waren te summier vermeld om er nader op in te kunnen gaan, zodat bij de experimenten door ons verricht slechts nagegaan kon worden in hoeverre onze resultaten overeenkwamen met die van Conrad en Schade. Hierbij zijn de proefomstandigheden, wat betreft concentratie etc., in onze experimenten identiek met die van Conrad en Schade uitgezonderd het feit dat wij duidelijk verschil gemaakt hebben tussen een aeroob en anaeroob milieu.

De waarnemingen van Conrad en Schade konden we slechts gedeeltelijk bevestigen. In onze experimenten kon met zekerheid worden vastgesteld, dat er slechts onder aerobe omstandigheden een Fe-ascorbinezuurcomplex ontstond. Onder aerobe omstandigheden namen we het volgende waar: Uitgaande van zowel een FeCl_2 als een FeCl_3 oplossing waaraan ascorbinezuur was toegevoegd werd, te beginnen bij pH 2 door middel van NaOH de pH verhoogd. Bij pH 6 begon een violette kleur zichtbaar te worden, zowel bij FeCl_2 als bij FeCl_3 . Het Fe van zowel de FeCl_2 als FeCl_3 oplossing in aanwezigheid van ascorbinezuur bleek oplosbaar te zijn tot pH 11, dit in tegenstelling tot de opvatting van genoemde auteurs. De absorptiespectra gemeten bij pH 7 bleken voor beide bovengenoemde oplossingen niet te verschillen. Een en ander wordt weergegeven in fig. III.3.

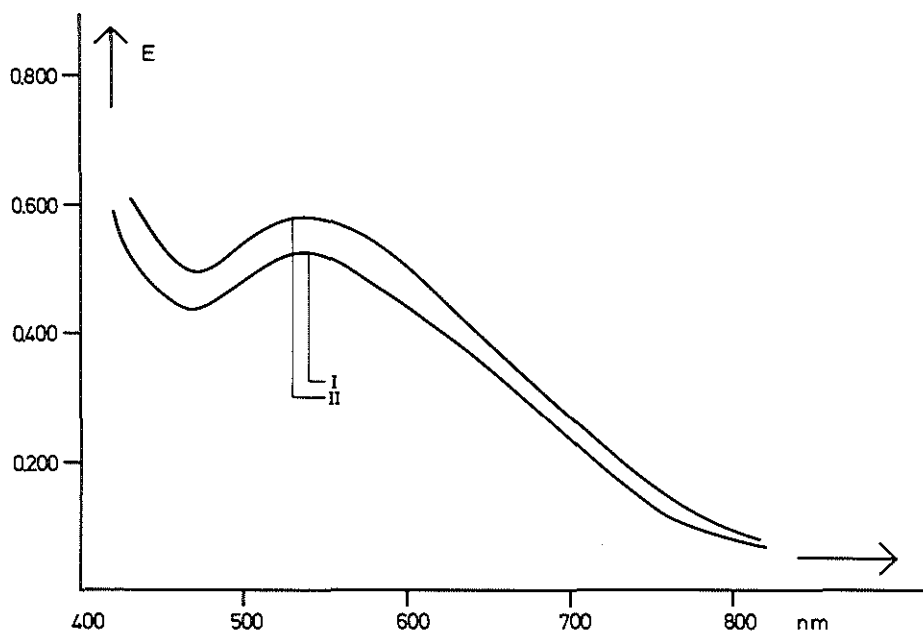


Fig III.3.

Absorptiespectra van oplossingen die Fe en ascorbinezuur bevatten.

- I) Absorptiespectrum van een oplossing verkregen door samenvoeging van FeCl_3 en ascorbinezuur in aerob milieu bij pH 7,0.
- II) Absorptiespectrum van een oplossing verkregen door samenvoeging van FeCl_2 en ascorbinezuur in aerob milieu bij pH 7,0.

Zie voor bijzonderheden de tekst.

Dezelfde proeven verricht onder anaerobe omstandigheden gaven een ander beeld. Uitgaande van zowel een FeCl_2 als een FeCl_3 oplossing in aanwezigheid van ascorbinezuur werd, te beginnen bij een pH van ongeveer 2, door middel van NaOH de pH verhoogd. Bij pH 7,5 trad een zeer zwakke violette kleur op, die echter veel minder intensief was dan onder aerobe omstandigheden. We waren niet in staat om absorptiespectra op te nemen vanwege de geringe extinctie van de oplossingen. Een pH groter dan 8 veroorzaakte in beide gevallen een groen precipitaat van ijzer (II) - hydroxide.

Voor het Fe (III) - ascorbinezuurcomplex, ontstaan onder aerobe omstandigheden met FeCl_3 bij pH 7,5, vonden we met Sephadex gelfiltratie een percentage van 12% met een molecuulmassa groter dan 1000 en kleiner dan 5000. Dit in tegenstelling met Conrad en Schade. Zij vonden, zoals boven vermeld, dat 25% van het Fe - ascorbinezuur complex een molecuulmassa groter dan 4000 zou bezitten. Wanneer we de geringe violette kleur, gemeten onder anaerobe omstandigheden, toeschrijven aan de experimentele moeilijkheden om O_2 volledig uit te sluiten, dan zijn we in staat onze experimenten als volgt te verklaren: Onder aerobe omstandigheden treedt bij pH 7, zelfs bij aanwezigheid van ascorbinezuur, oxidatie op van Fe (II) tot Fe (III), zoals uit onze proeven in paragraaf 2 van dit hoofdstuk blijkt. Het ontstane Fe (III) reageert met ascorbinezuur en veroorzaakt de violette kleur. Wanneer het Fe-ascorbinezuurcomplex eenmaal gevormd is, blijft het over een pH gebied van 7 tot 11 in oplossing. Onder anaerobe omstandigheden treedt geen oxidatie op van Fe (II) met uitzondering van een zeer gering percentage, hetgeen door het optreden van sporen O_2 te verklaren is. Het Fe - ascorbinezuurcomplex wordt dan ook niet gevormd, zodat bij verhoging van de pH tot 8 volledige precipitatie van het Fe (II) is opgetreden. Onder anaerobe omstandigheden zal integendeel zowel in zuur als in alkalisch milieu Fe (III) door ascorbinezuur worden gereduceerd. Dat er dus zowel met FeCl_3 als met FeCl_2 in anaeroob milieu geen violette kleur ontstaat en dus geen Fe - ascorbinezuurcomplex is te verklaren als aangenomen wordt dat Fe (II) niet met ascorbinezuur reageert.

Onder aerobe omstandigheden zal bij een niet te zure pH van ongeveer 7 altijd oxidatie optreden van Fe (II) naar Fe (III), zoals uit onze proeven in paragraaf 2 van dit hoofdstuk blijkt. Dat in sterk zuur milieu geen Fe - ascorbinezuurcomplex ontstaat is nu te verklaren door het feit dat Fe (III) bij deze zuurgraad door ascorbinezuur direct wordt gereduceerd tot Fe (II) waarvan wij aannamen dat het geen complex vormt. Bij pH 7 en in

alkalisch milieu vinden wij dat zowel FeCl_2 als FeCl_3 met ascorbinezuur een zichtbaar complex vormt met eenzelfde absorptiespectrum. Dit kunnen we ons inziens verklaren door aan te nemen dat slechts Fe (III) met ascorbinezuur een complex vormt.

De resultaten, verkregen door Conrad en Schade bij de elementaire analyse en de infraroodspectrophotometrie, zijn in onze ogen niet zo overtuigend, omdat de gevonden verschillen in samenstelling tussen de beide Fe -ascorbinezuurcomplexen van dezelfde grootte orde zijn als de verschillen van de dubbele bepalingen onderling. Bij de infraroodspectrophotometrie is bovendien niet nagegaan in hoeverre het ontstane dehydroascorbinezuur invloed heeft op het spectrum, hetgeen ongetwijfeld het geval is. De veronderstelling van Conrad en Schade dat het om twee verschillende ijzercomplexen zou gaan, en wel een Fe (II) - en een Fe (III) complex, kan door ons dus niet worden onderschreven. Er is ons inziens slechts één complex en wel van Fe (III) met ascorbinezuur.

§ 4 De ontleding van ascorbinezuur en de invloed van deze stof op het $\text{Fe (II)} \rightleftharpoons \text{Fe (III)}$ evenwicht onder anaerobe omstandigheden.

Dat zuurstof invloed zou hebben op het ijzer-transferrine systeem werd voor het eerst naar voren gebracht door Schade en medewerkers in 1949 en naderhand door Koechlin in 1952. Hun bewijzen voor deze opvatting zijn weinig uitgewerkt en er is naderhand geen aandacht aan dit punt besteed. Teneinde bovenstaande beweringen nader te onderzoeken, ontwierpen we een werkwijze waarbij strikt anaerobe omstandigheden heersten. De invloed van ascorbinezuur, waarop Schade ook wees, het bicarbonaat ion en zuurstof op het ijzer-transferrine systeem zal nader beschreven worden in Hoofdstuk IV. In deze paragraaf zal slechts ingegaan worden op de karakterisering van het ijzer-ascorbinezuur systeem onder anaerobe omstandigheden, waarbij de valentie van het Fe en de ontleding van ascorbinezuur nader onderzocht zullen worden. Teneinde een volstrekt anaeroob milieu te verkrijgen werd N_2 door de oplossing geleid. N_2 werd alvorens het door oplossing gebracht werd, door een alkalische dithioniet oplossing geleid om eventueel aanwezige zuurstof te verwijderen. Technische details werden reeds beschreven in hoofdstuk II. De opzet van de experimenten is verder identiek met de reeds genoemde proeven in paragraaf 1, maar in plaats van bekerglazen werden erlenmeyers van 1 liter gebruikt. Voor de samenstelling van de oplossing in de diverse experimenten, zie tabel III.4.

Tabel III.4.

De ontleding van ascorbinezuur in anaeroob milieu en de invloed van Fe (II) hierop.

Experiment	Tijdsduur (uren)	Fe ($\mu\text{mol/l}$)	Ascorbinezuur ($\mu\text{mol/l}$)	
			Beginconc.	Eindconc.
1	48	—	2860	2740
2	48	40	2860	2680
3	48	140	2860	2610
4	6	—	580	570
5	6	20	580	560
6	6	60	2860	2780
7	6	100	2860	2750

Zoals uit deze tabel is af te leiden, blijkt de ontleding van ascorbinezuur onder anaerobe omstandigheden niet bijzonder groot te zijn. Vooral bij de periode van 48 uur is dit zeer duidelijk, want onder aerobe omstandigheden is de ontleding over dit tijdsverloop vrijwel volledig. Vanwege de geringe optredende oxidatie van het ascorbinezuur gedurende een periode van 48 uur in anaeroob milieu, werd nagegaan in hoeverre een Fe (II) oplossing bij pH 7,4 onder anaerobe omstandigheden gedurende een periode van 6 uur en langer in gereduceerde toestand gehouden kon worden met ascorbinezuur. De experimenten werden verricht in het door ons geconstrueerde reactievat. Voor technische bijzonderheden zij verwezen naar hoofdstuk II, paragraaf 5. Aan 50,0 ml fosfaatbuffer (concentratie 0,05 mol/l) pH 7,4 werd vanuit een standaardoplossing van Fe (II) de benodigde hoeveelheid Fe in het reactievat gepipetteerd. Vervolgens werd vanuit een standaardoplossing ascorbinezuur toegevoegd tot een eindconcentratie van 2860 $\mu\text{mol/l}$. De werkwijze wat betreft het zuurstofvrij maken en zuurstofvrij houden van de oplossing is beschreven in hoofdstuk II. Op verschillende tijdstippen werd de Fe (II) concentratie bepaald, zoals beschreven in hoofdstuk II. Tabel III.5 geeft een overzicht, wat betreft de Fe (II) concentraties op $t=0$ uur en de daarop volgende tijdstippen. Zoals tabel III.5 weergeeft treedt gedurende de periodes van 0 - 6 uur vrijwel geen oxidatie op. Na 24 uur is vooral bij de hogere concentraties een geringe oxidatie opgetreden, ondanks het zogoed als volledig van de buitenlucht afgesloten systeem. Waarschijnlijk is de reden van de oxidatie van Fe (II) de aanwezigheid van sporen zuurstof in N_2 gas, die niet volledig verwijderd worden door de alkalische dithioniet oplossing en die, gemeten over een langere periode, tot een oxidatie van Fe (II) kan leiden.

Tabel III.5.

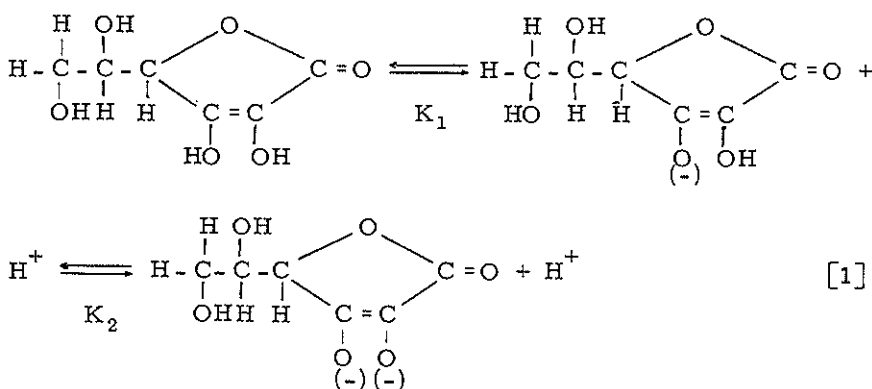
Het verloop in de tijd van de Fe (II) -concentratie onder anaerobe omstandigheden in een fosfaatbuffer 0,05 mol/l pH 7,4, waaraan ascorbinezuur (2860 $\mu\text{mol/l}$) was toegevoegd.

	[Fe] $\mu\text{mol/l}$	[Fe] $\mu\text{mol/l}$	[Fe] $\mu\text{mol/l}$	[Fe] $\mu\text{mol/l}$
t = 0 uur	10,0	15,0	60,0	100,0
t = 2 uur	9,8	14,7	59,5	99,5
t = 4 uur	9,7	14,6	59,3	99,2
t = 6 uur	9,6	14,5	59,2	99,1
t = 24 uur	9,6	14,3	55,5	94,4

§ 5 De redoxpotential van het ascorbinezuur - dehydroascorbininezuur systeem in anaeroob milieu.

Ascorbinezuur staat, zoals in de inleiding werd beschreven, in reversibel evenwicht met dehydroascorbinezuur. De moeilijkheden die optreden bij metingen van de redoxpotential van dit ascorbinezuur systeem zijn in de eerste plaats te wijten aan het feit, dat het electrode-proces bij een pH groter dan 5 bijzonder langzaam verloopt. In de tweede plaats gaat bij langdurige proeven de toenemende ontleding van het dehydroascorbininezuur een rol spelen. Door gebruik te maken van een geschikte mediator zoals beschreven door Ball (33) is het mogelijk het evenwichtsproces aan de electrode sneller tot stand te laten komen.

Bij de berekening van de redoxpotential spelen de dissociatie constanten van het ascorbinezuur een belangrijke rol. Onderstaande reactie geeft het verloop van de mogelijke dissociatiestappen van het ascorbinezuur weer.



Taqui Khan (34) geeft voor K_1 een waarde, die $9,16 \times 10^{-5}$ bedraagt, en voor K_2 een waarde van $4,57 \times 10^{-12}$ (25°C). Voor systeem kan men volgens Ball schrijven:

$$E^h = E^\circ + \frac{0,058}{n} \log \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} + \frac{0,058}{n} \log (K_1 [\text{H}^+] + K_1 K_2 + [\text{H}^+]^2) \quad [2]$$

($t = 20^\circ\text{C}$)

waarbij:

E^h = redoxpotential

E° = standaardredoxpotential

K_1 en K_2 zijn de dissociatieconstanten

n = aantal deelnemende electronen

$[\text{ox}]$ = concentratie dehydroascorbinezuur

$[\text{red}]$ = concentratie ascorbinezuur

Bij lage pH waarden geldt $[\text{H}^+]^2 \gg K_1 [\text{H}^+] + K_1 K_2$
De bovengenoemde vergelijking gaat dan over in:

$$E^h = E^\circ + \frac{0,058}{n} \log \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} - 0,058 \text{ pH} \quad [3]$$

Onder minder zure omstandigheden is $K_1 [\text{H}^+] \gg [\text{H}^+]^2 + K_1 K_2$ en geldt:

$$E^h = E^\circ + \frac{0,058}{n} \log K_1 [\text{H}^+] + \frac{0,058}{n} \log \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} \quad [4]$$

Onder meer basische omstandigheden wordt de redoxpotential berekend volgens de onderstaande vergelijking:

$$E^h = E^\circ + \frac{0,058}{n} \log K_1 K_2 + \frac{0,058}{n} \log \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} \quad [5]$$

Definieren we $E_o^1 = E^\circ + \frac{0,058}{n} \log ([\text{H}^+]^2 + K_1 [\text{H}^+] + K_1 K_2)$

dan geeft fig III.4 het verband weer tussen E_o^1 en de pH.

Bij pH 7,40 is E_o^1 0,044 V.

De experimenten zijn verricht bij pH 7,40 zodat voor de redoxpotential de volgende vergelijking geldt:

$$E^h = 0,044 + 0,029 \log \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} \quad [6]$$

In de volgende experimenten is nagegaan in welke mate de gemeten redoxpotentialen in een fosfaatbuffer pH 7,4 overeenkomen

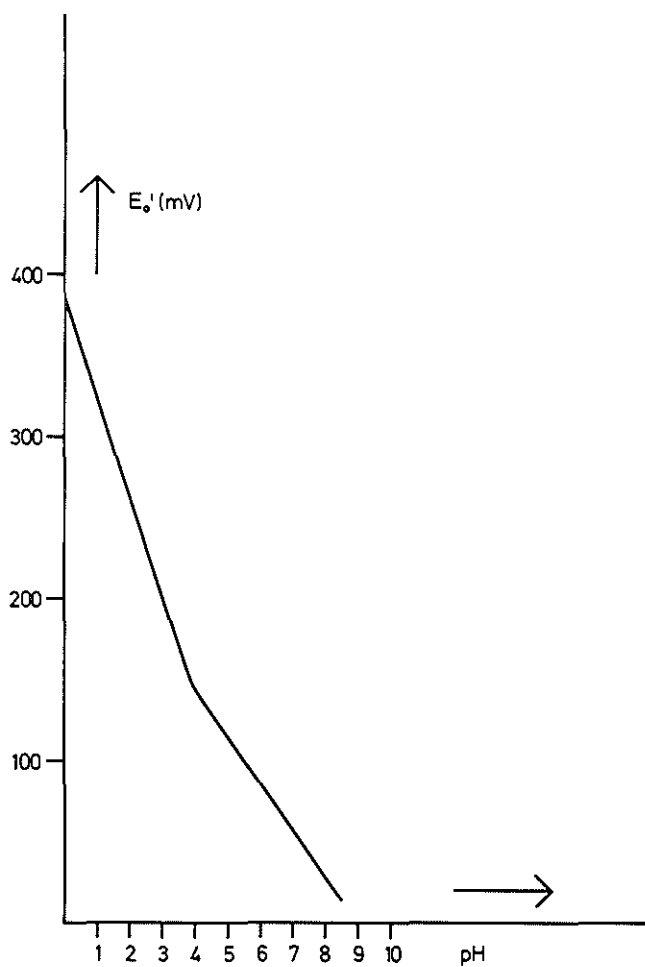


fig III.4.

Verband tussen de E_0' en de pH in het ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur systeem.

met de literatuuropgaven betreffende het ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur systeem in H_2O . De experimenten werden als volgt uitgevoerd: Aan 100 ml fosfaatbuffer (conc. 0,05 mol/l) pH 7,4, die vacuum gezogen en gedurende 2 uur met N_2 geëquilibreerd was, werd ascorbinezuur vanuit een standaardoplossing toegevoegd tot de vereiste concentratie was bereikt. Na toevoeging van 1 ml thionine 0,001 mol/l als mediator werd 2 en $2\frac{1}{2}$ uur na toevoegen van thionine de redoxpotentiaal gemeten. Wanneer de potentiaal niet meer verschilde dan 2 mV werd de meting beëindigd. Bij grotere verschillen dan 2 mV werd de aflezing na nogmaals $\frac{1}{2}$ uur verricht tot het vereiste verschil van niet meer dan 2 mV was opgetreden. Voor technische details wordt verwezen naar hoofdstuk II.

De redoxpotentiaal van het ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur systeem blijkt in fosfaatbuffer vrijwel onafhankelijk te zijn van de toegevoegde hoeveelheid ascorbinezuur. Een gemiddelde redoxpotentiaal van -0,047 V (-0,044 V, -0,047 V, -0,050 V) gemeten bij de drie ascorbinezuurconcentraties 2800-, 4200- en 5600 μ mol/l werd gevonden. De door Green (35) bij pH 7,45 gevonden redoxpotentiaal bedroeg -0,067 V, hetgeen in redelijke overeenstemming is met de door ons gevonden waarde. Dat bovengenoemde waarde van Green enigszins lager ligt, kan waarschijnlijk verklaard worden door verschil in toegepaste techniek. Duidelijk blijkt, dat de redoxpotentiaal van het ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur weinig afhankelijk is van de beginconcentratie van het ascorbinezuur.

Bij een 50% oxidatie van ascorbinezuur door middel van $K_3Fe(CN)_6$ toevoeging, blijkt de gemeten E_o^1 bij pH 7,40 + 35 mV te bedragen. De theoretisch berekende waarde bedraagt + 44 mV (vergelijking 6). De in de literatuur gevonden en onze eigen waarden voor de E_o^1 worden weergegeven in tabel III. 6

Tabel III. 6.

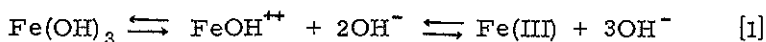
Enkele E_o^1 waarden van het ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur systeem.

Auteurs	pH	E_o^1 (mV)
Ball (33), gemeten	7,40	51,2
*Data for Biochemical Res. (36)	7,00	58,0
*Mahler (37)	7,00	80,0
Eigen waarnemingen		
gemeten	7,40	35,0
berekend (verg 6)	7,40	44,0
berekend (verg 5)	7,00	58,0

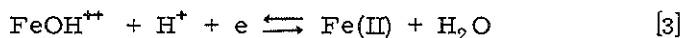
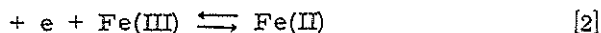
*Het is niet na te gaan in hoeverre deze waarden verkregen zijn door meting dan wel door berekening.

§ 6 *De Redoxpotentiaal van het Fe (II) - Fe (III) systeem in anaeroob milieu.*

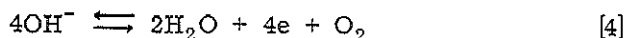
In de voorgaande paragrafen werd reeds opgemerkt dat het Fe (II) - Fe (III) systeem gekarakteriseerd kan worden door middel van de redoxpotentiaal van het systeem. Harvey (38) nam waar, dat zelfs in alkalisch milieu in aanwezigheid van 2, 2' - dipiridyl uit het Fe (III) - hydroxide het rode complex van Fe (II) - dipiridyl gevormd werd. Onderstaande reactievergelijkingen, die door Cooper (39) beschreven zijn, geven hiervoor een verklaring.



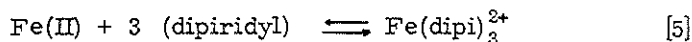
De gevormde Fe (III) ionen zijn in evenwicht met Fe (II) ionen



Als electrondonor kan het hydroxylion dienst doen



De in vergelijking (2) bestaande Fe (II) ionen zullen volgens onderstaande vergelijking met 2, 2' - dipiridyl reageren:



Het laatste evenwicht ligt vrijwel volledig naar rechts. Uiteindelijk zal (zie vergelijking 1, 2, 3, 4 en 5) het Fe(OH)₃ volledig opgelost en omgezet zijn in het Fe (II) - dipiridyl complex.

De reactievergelijkingen (1, 2 en 3) vormen de basis voor de karakterisering van het Fe (II) - Fe (III) systeem, met betrekking tot de redoxpotentiaal zoals door Cooper (40) uitvoerig is beschreven.

De potentiaal van het Fe (II) - Fe (III) systeem gemeten ten opzichte van waterstofelectrode (E^h) wordt weergegeven door de vergelijking

$$E^h = E^o + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{Fe(III)}}}{a_{\text{Fe(II)}}} \quad [6]$$

waarin E^o de standaardpotentiaal is en a_{Fe (II)} en a_{Fe (III)} de activiteiten van de Fe (II) en Fe (III) concentraties zijn. Bij een pH 7,4 wordt de a_{Fe (III)} beheerst door het oplosbaarheidspro-

duct van Fe (III) - hydroxide (S).

$$a_{\text{Fe(III)}} = \frac{S}{a_{\text{OH}^-}^3} = \frac{S \cdot a_{\text{H}^+}^3}{K_{\text{H}_2\text{O}}^3} \quad [7]$$

Hiermede gaat vergelijking (6) door substitutie van $a_{\text{Fe(III)}}$ over in:

$$E^h = E^o + \frac{RT}{F} \ln \frac{S \cdot a_{\text{H}^+}^3}{K_{\text{H}_2\text{O}}^3 \cdot a_{\text{Fe(II)}}} \quad [8]$$

Wanneer $a_{\text{Fe(II)}}$ vervangen wordt door $\gamma_{\text{Fe(II)}} \cdot m_{\text{Fe(II)}}$, waarbij γ de activiteitscoëfficiënt is en we de $10 \log$ invoeren, gaat vergelijking (8) over in:

$$E^h = E^o + 0,058 \log \frac{S \cdot [\text{H}^+]^3}{K_{\text{H}_2\text{O}}^3 \cdot \gamma_{\text{Fe(II)}} \cdot m_{\text{Fe(II)}}} \quad [9]$$

$$\text{Stel: } E_1^o = E^o + 0,058 \log \frac{S}{K_{\text{H}_2\text{O}}^3 \cdot \gamma_{\text{Fe(II)}}} \quad [10]$$

(temp 20°C)

Substitutie van (10) doet vergelijking (9) overgaan in:

$$E^h = E_1^o - 0,058 \log m_{\text{Fe(II)}} - 0,174 \text{ pH} \quad [11]$$

Kriukov en Awsejewitsch (41) vonden voor E_1^o een waarde van 1,011 V. Hiermede gaat vergelijking (11) over in de door Cooper afgeleide vergelijking:

$$E^h = 1,011 - 0,058 \log m_{\text{Fe(II)}} - 0,174 \text{ pH} \quad [12]$$

(temp. 20°C)

De bedoeling van de navolgende te bespreken proeven is na te gaan of het Fe (II) - Fe (III) systeem in fosfaatbuffer pH 7,4 onder anaerobe omstandigheden met vergelijking (12) kan worden beschreven. De details van de proefopzet waarbij anaerobe omstandigheden heersten, zijn beschreven in hoofdstuk II. De experimenten werden als volgt verricht: 100 ml fosfaatbuffer pH 7,4 werd in het reactievat gebracht. Hieraan werd vanuit een standaardoplossing de vereiste Fe (II) concentratie toegevoegd. Na 30 minuten werd de redoxpotentiaal gemeten. Wan-

neer de potentiaal na 60 minuten niet meer verschilde dan 2 mV met de eerste waarneming, werd de potentiaal na 60 minuten als definitieve uitslag beschouwd. Tabel III.7 geeft de resultaten weer wat betreft de Fe (II) concentratie als de gemeten redoxpotentiaal.

Tabel III.7.

Verband tussen de Fe (II) -concentratie en de gemeten redoxpotentiaal in fosfaatbuffer 0,05 mol/l pH 7,4.

Fe (II) ($\mu\text{mol/l}$)		E^h
(toegevoegd)	(bep. t = 60 min)	(mV)
3,9	3,9	+ 22
7,7	7,8	- 4
11,6	11,8	- 20
15,4	16,4	- 30
100,3	99,8	- 62

Fig III.5 geeft het verband weer tussen de gevonden waarden voor de redoxpotentiaal en $-\log \text{Fe (II)}$ en tevens de berekende redoxpotentiaal met vergelijking (12).

Uit de gevonden Fe (II) concentraties in tabel III.5 werd door berekening een rechte lijn verkregen, wanneer de pH tijdens de experimenten gelijk bleef. De experimenteel gevonden curve lag in het algemeen wat lager dan de berekende curve verkregen volgens Cooper. Cooper leidde zijn vergelijking voor het Fe (II) - Fe (III) systeem af voor water. Er is een redelijke overeenstemming wat betreft de berekende grootte van de redoxpotentiaal volgens Cooper uit de experimenteel bepaalde Fe (II) concentratie en de gemeten grootte van de redoxpotentiaal.

Het probleem rijst, of de aanwezigheid van fosfaationen invloed heeft op het Fe (II) - Fe (III) systeem. Dit in verband met het zeer lage oplosbaarheidsproduct van FePO_4 wat een waarde heeft van 10^{-32} bij pH 8,0 (39). Cooper hield bij zijn afleiding geen rekening met fosfaat. Uit de redelijke overeenstemming tussen de experimenteel gevonden afhankelijkheid van Fe (II) en de redoxpotentiaal en de berekende afhankelijkheid menen wij te mogen afleiden, dat fosfaatbuffer geen of weinig invloed heeft op het Fe (II) - Fe (III) systeem onder anaerobe omstandigheden.

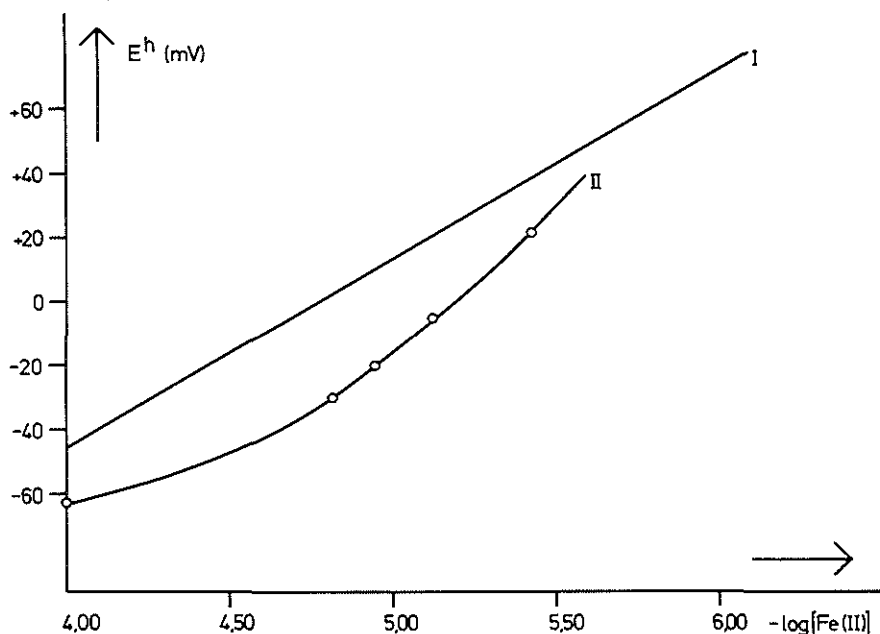


Fig III.5.

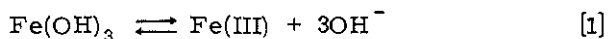
Het verband tussen de redoxpotentiaal en de Fe (II) concentratie in het Fe (II) - Fe (III) systeem.

- I) De theoretische curve bij pH 7,4 verkregen met behulp van de door Cooper opgestelde vergelijking.
 II) De experimenteel gevonden curve, die het verband weergeeft tussen de redoxpotentiaal en de Fe (II) concentratie in fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4.

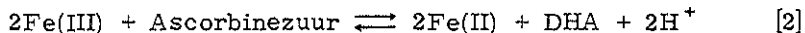
§ 7 De redoxpotentiaal van het Fe (II) - Fe (III) systeem in aanwezigheid van ascorbinezuur in anaeroob milieu.

In de paragrafen 5 resp. 6 werd nader ingegaan op de bestudering van het ascorbinezuur - dehydroascorbinezuur - resp het Fe (II) - Fe (III) systeem, aan de hand van metingen van de redoxpotentiaal. In deze paragraaf wordt nagegaan in hoeverre het Fe (II) - Fe (III) systeem in aanwezigheid van ascorbinezuur door middel van de redoxpotentiaal kan worden gekarakteriseerd met behulp van de in de paragrafen 5 en 6 gegeven vergelijkingen. Bij de beschrijving in paragraaf 6 van het Fe (II) - Fe (III) systeem volgens Cooper werd gebruik gemaakt van het uitgangspunt dat de oplossing verzadigd was met Fe(OH)_3 . Volgens on-

derstaande reactie zal er dan een constante concentratie van Fe (III) ionen bestaan.



Het evenwicht:



zal slechts beschreven kunnen worden door middel van de formule voor de redoxpotentiaal van het Fe (II) - Fe (III) systeem van Cooper, wanneer de Fe (III) concentratie beheerst wordt door het feit, dat de oplossing met Fe(OH)_3 verzadigd is. Teneinde na te gaan of dit het geval is, berekenden wij uit de gemeten redoxpotentiaal van een aantal oplossingen de concentratie van Fe (III) ionen die aanwezig zou zijn en vergeleken deze met de Fe (III) concentratie die in een oplossing, verzadigd met Fe(OH)_3 , moet heersen.

De volgende experimenten werden daarvoor uitgevoerd. Aan 100 ml fosfaatbuffer 0,05 molair werd vanuit een standaardoplossing ascorbinezuur toegevoegd (eindconc. 2,9 mmol/l). Vervolgens werd Fe (III) vanuit een standaardoplossing in het reactievat gepipetteerd. De experimenten werden onder anaerobe omstandigheden verricht, gedurende de proef werd N_2 doorgeleid. Voor verdere technische details wordt verwezen naar Hoofdstuk II. Het bleek, zoals Fig III.6 aangeeft, dat het bestudeerde evenwicht zich slechts langzaam instelde.

Dit kan erop duiden dat de redoxpotentialen van de beide systemen niet veel verschillen. Uit de gemeten redoxpotentiaal kan de concentratie van Fe (III) ionen als volgt berekend worden:

$$E_{\text{systeem}}^h = E_{\text{Fe(II)/Fe(III)}}^h + E_{\text{Asc/DHA}}^h \quad [3]$$

waarin:

E_{systeem}^h	: de gemeten redoxpotentiaal is van het systeem nadat evenwicht is ingetreden.
$E_{\text{Fe (II)/Fe (III)}}^h$: de redoxpotentiaal van het Fe (II) - Fe (III) systeem is.
$E_{\text{Asc/DHA}}^h$: de redoxpotentiaal van het ascorbinezuur - dehydroascorbinezuur is.

Met behulp van de vergelijkingen 6 resp. 6 in de paragrafen

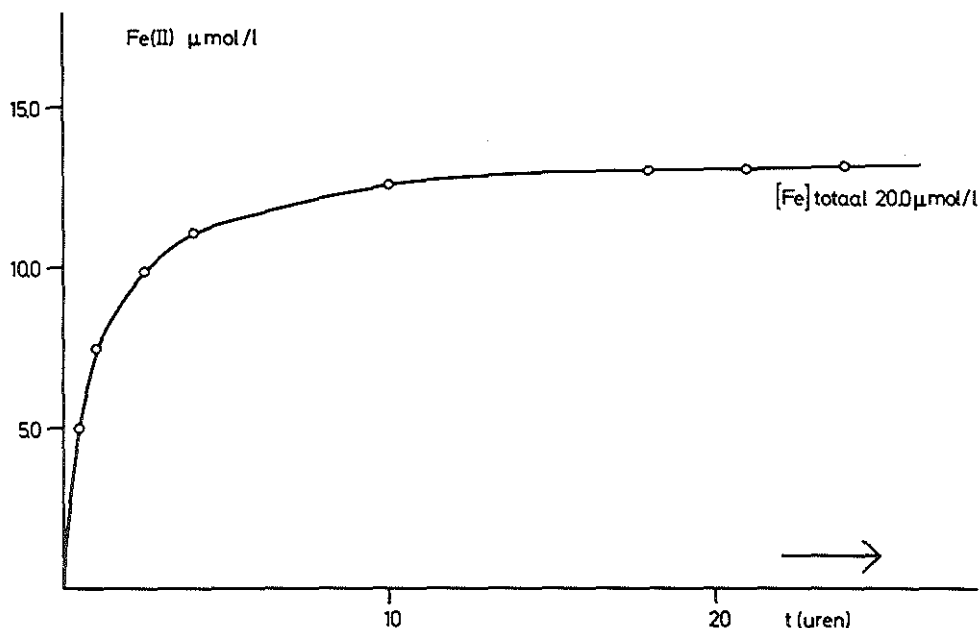


Fig III.6.

De reductie van Fe (III) door ascorbinezuur (2860 μmol/l) onder anaerobe omstandigheden.

5 resp. 6 kan de vergelijking 3 als volgt worden gevormd:

$$E^h_{\text{systeem}} = E^{\circ}_{(\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)})} - 0,058 \log \frac{[\text{Fe(II)}]}{[\text{Fe(III)}]} + E^{\circ}_{\text{Asc/DHA}} - 0,029 \log \frac{[\text{Asc}]}{[\text{DHA}]} \quad [4]$$

waarin:

- $E^{\circ}_{(\text{Fe (II)}/\text{Fe (III)})}$: de standaardpotentiaal van het Fe (II)-Fe (III) systeem is.
- $E^{\circ}_{(\text{Asc/DHA})}$: de standaardpotentiaal van het ascorbinezuur-dehydroascorbinezuur is.

De Fe (II) ionenconcentratie werd gemeten met de in hoofdstuk II beschreven methode.

De E° waarde van het Fe (II) - Fe (III) systeem, die Cooper gebruikte en door Bray en Hershey (42) experimenteel werd gevonden, bedroeg 0,722 V. De E° waarde van het ascorbinezuur-

dehydroascorbinezuur bedroeg volgens eigen waarneming 0,035 V. Met behulp van de bovengenoemde E^0 's, de ascorbinezuurconcentratie, dehydroascorbinezuurconcentratie en de gemeten Fe (II) concentratie, kan de Fe (III) ionenconcentratie berekend worden. Volgens vergelijking [2] geldt, dat de Fe (II) ionenconcentratie tweemaal groter is dan de dehydroascorbinezuurconcentratie, hiermede werd de dehydroascorbinezuurconcentratie uit de gemeten Fe (II) concentratie afgeleid.

In tabel III.8 is een overzicht weergegeven van de gemeten redoxpotentiaal en de gemeten Fe (II) ionenconcentratie.

Tabel III.8.

De met behulp van vergelijking 4 berekende Fe (III) -ionenconcentratie in een milieu bestaande uit Fe (II), Fe (III), Ascorbinezuur en Dehydroascorbinezuur. De beginconcentratie van Ascorbinezuur bedroeg 2860 $\mu\text{mol/l}$.

Tijd (uren)	Fe _{tot.} ($\mu\text{mol/l}$) Toegevoegd als Fe (III)	Fe (II) ($\mu\text{mol/l}$) gemeten na evenwicht	E^h (mV) gemeten na evenwicht	Fe (III) ($\mu\text{mol/l}$) berekend
24	11,7	11,0	- 20	$1,4 \times 10^{-18}$
24	20,0	13,2	- 24	$1,3 \times 10^{-18}$
24	40,2	18,2	- 31	$1,1 \times 10^{-18}$
24	60,2	20,8	- 34	$1,1 \times 10^{-18}$
48	94,0	27,2	- 39	$1,1 \times 10^{-18}$

Verder is de op grond van vergelijking [4] berekende Fe (III) ionenconcentratie aangegeven. Deze berekende Fe (III) ionenconcentratie vertoont een goede overeenkomst met de Fe (III) ionenconcentratie, die op grond van het oplosbaarheidsproduct van $\text{Fe}(\text{OH})_3$ zou moeten bestaan. Cooper vond voor het oplosbaarheidsproduct een waarde van $2,5 \times 10^{-38}$, terwijl Feitknecht (43) een waarde van 4×10^{-38} opgeeft. Het oplosbaarheidsproduct: $S = \text{Fe (III)} \cdot [\text{OH}^-]^3$ werd door ons met de gemiddelde Fe (III) ionenconcentratie uit tabel III.8 berekend.

$$\text{Fe (III)} = 1,2 \times 10^{-18}$$

$$[\text{OH}^-] = 2,5 \times 10^{-7}$$

$$S = 1,9 \times 10^{-38}$$

Uit bovenstaande gegevens blijkt, dat de Fe (III) ionenconcentratie beheerst wordt door het oplosbaarheidsproduct van $\text{Fe}(\text{OH})_3$. De veronderstelling, dat het Fe (II) - Fe (III) evenwicht ook in aanwezigheid van ascorbinezuur gekarakteriseerd kan worden met Cooper's formulering van de redoxpotentiaal, bleek juist.

HOOFDSTUK IV.

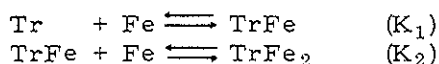
DE BESTUDERING VAN HET IJZER - TRANSFERRINE SYSTEEM IN VITRO.

Inleiding.

In het vorige hoofdstuk werd uitvoerig ingegaan op de karakterisering van het Fe - ascorbinezuur systeem. Hierbij werd zowel onder aerobe als onder anaerobe omstandigheden gewerkt, teneinde de invloed van zuurstof na te gaan. Na bestudering van genoemd systeem was de volgende stap in onze experimenten de uitbreiding van dit systeem met transferrine. Onze bedoeling daarmee was om de binding tussen Fe en transferrine zowel onder anaerobe als onder aerobe omstandigheden te onderzoeken. De door ons hiervoor toegepaste werkwijzen waren die van ultrafiltratie en dialyse.

Glaser gaf een uitvoerige uiteenzetting omtrent het gebruik van de dialyse - opzet voor het bestuderen van het Fe - transferrine systeem. Het grondprincipe is de bepaling van de vrije Fe concentratie. Glaser koos voor een verhouding buitenvloeistof: binnenvloeistof (waarin transferrine) van 25:1 of 11:2 om redenen door hem genoemd. Onze verhouding was buitenvloeistof (waarin transferrine): binnenvloeistof 25:1 of 20:1. Onze opstelling was dus geheel verschillend. Onze opstelling berust op het uitgangspunt, dat door dialyse zo weinig mogelijk veranderd moet worden aan het evenwicht tussen Fe en transferrine, dat in de buitenvloeistof bestaat. Wij kozen dit uitgangspunt met het oog op de in vivo dialyse experimenten, die in hoofdstuk V besproken zullen worden. Bij deze experimenten is het noodzakelijk, dat de concentratie van allerlei stoffen in het bloed door dialyse geen grote verandering ondergaat.

Uitgaande van de opvatting dat de reactie tussen Fe en transferrine in twee stappen plaatsvindt, werd door verschillende onderzoekers, zoals in hoofdstuk I reeds vermeld, de evenwichtsconstanten K_1 en K_2 bepaald.



De waarden die Glaser vond voor de K - waarden zouden een onverwacht hoge concentratie van niet aan transferrine gebonden

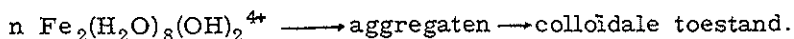
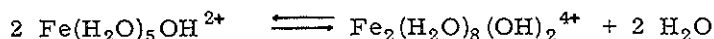
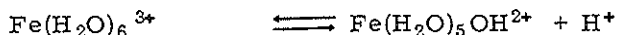
Fe doen vermoeden, terwijl wanneer de K - waarden van Davis (8) en Aasa (9) van toepassing zouden zijn, er geen sprake is van niet aan transferrine gebonden Fe. Voor de K - waarden van de diverse auteurs zij verwezen naar tabel I.1.

Om tot een beter inzicht te komen, alvorens tot in vivo proeven over te gaan, werd in de eerste plaats de in vitro situatie nader bestudeerd met behulp van het in hoofdstuk III nauwkeurig gekarakteriseerde Fe - ascorbinezuur systeem. Daarbij werd gebruik gemaakt van, zoals reeds eerder vermeld, dialyse en ultrafiltratie.

In de eerste plaats zal de wijze van oplading van het transferrine en de ultrafiltratie - opzet nader besproken worden. Daarna komen de eigenlijke dialyse - en ultrafiltratie proeven aan de orde.

§ 1 *De techniek van oplading van transferrine met Fe.*

Door onderzoek over de paramagnetische susceptibiliteit van het opgeladen transferrine werd door Michaelis (44) en verder door Ehrenberg en Laurell (45) gevonden, dat het Fe in transferrine opgevat kan worden als Fe (III) in ionogene vorm. Door middel van E.S.R. metingen bevestigde Malmström (46) bovenstaande opvattingen. Ook Glaser vond dezelfde resultaten met E.S.R. metingen en stelde vast, dat de oplading hetzij met Fe (II) hetzij met Fe (III) tot hetzelfde transferrine - Fe complex leidt. Op grond van deze waarnemingen ligt het voor de hand het transferrine met Fe (III) op te laden. De moeilijkheid die hierbij naar voren komt is het gecompliceerde karakter van Fe (III) in waterig milieu, en de geringe oplosbaarheid van Fe (III) bij pH 7,4. Volgens Mulay (47) en Hedström (48a) en Gray (48b) en Schugar (48c) is slechts in zeer zure oplossingen van pH ongeveer 0,2 het Fe (III) als ion te beschouwen. Bij een pH van ongeveer 2,5 treden dimeren op en bij een nog hogere pH ontstaan vaak grotere aggregaten en tenslotte zelfs een colloïdale oplossing. Onderstaande reactievergelijkingen ontleend aan het werk van Mulay en Gray geven enige informatie omtrent het gedrag van Fe (III) in waterig milieu.



Een alternatief voor een Fe (III) - oplossing is een Fe (II) - oplossing.

Het oplosbaarheidsproduct is voldoende groot om het Fe (II) bij pH 7,4 in oplossing te houden bij die concentratie van Fe, die we wensten te gebruiken. Het voordeel van Fe (II) is bovendien dat de gecompliceerde structuren, zoals die optreden bij Fe (III) in waterig milieu, voor Fe (II) ons niet bekend zijn. Een tweede alternatief voor een Fe (II) oplossing is de mogelijkheid Fe (III) -chelaten te gebruiken, zoals door Davis en Aasa werd gedaan. Van de drie mogelijkheden is de laatste de minst physiologische en door ons dan ook niet onderzocht. De twee andere mogelijkheden zijn onderzocht, teneinde die oplading te vinden, die het snelst en het meest efficiënt verliep. Deze mogelijkheid werd vervolgens als werkwijze gekozen op grond van de overweging, dat niet bekend is hoe de oplading van transferrine door middel van Fe in vivo verloopt. Teneinde genoemde twee mogelijkheden te onderzoeken werden experimenten met zowel Fe (II) als Fe (III) verricht. De oplading met Fe (II) verliep als volgt: Aan 1,00 ml fosfaatbuffer 0,05 molair (pH 7,4) werd vanuit een oplossing 0,03 ml ascorbinezuur (conc. 85 mmol/l), 0,02 ml natriumbicarbonaat (conc. 1 mol/l) en 0,15 ml transferrine oplossing (conc. 0,20 mmol/l) toegevoegd. Vervolgens werd 0,15 ml toegevoegd vanuit een standaardoplossing, die een Fe (II) concentratie had van 0,30 mmol/l of 0,80 mmol/l, aan bovenstaand mengsel. Op verschillende tijden werd de toename van de extinctie gemeten bij 470 nm.

Bij de oplading van transferrine met Fe (III) waren de toegevoegde hoeveelheden ascorbinezuur en natriumbicarbonaat identiek met die bij de oplading van transferrine met Fe (II). Het beginvolume was eveneens 1,00 ml fosfaatbuffer (0,05 mol/l) (pH 7,4). De toegevoegde hoeveelheid transferrine bedroeg 0,15 ml (conc. 0,30 mmol/l). Bij de oplading van transferrine met Fe (III) werd 0,15 ml vanuit een standaardoplossing, die een Fe (III) concentratie had van 0,4 mmol/l of 0,8 mmol/l, gepipetteerd in het reactiemengsel. Evenals bij de reactie van Fe (II) met transferrine werd bij de oplading van transferrine met Fe (III) de toename van de extinctie bij 470 nm gemeten. Het eindvolume van het reactiemengsel bedroeg in alle gevallen 1,35 ml. De standaardoplossing en van Fe (II) en van Fe (III) hadden een pH van 2; voor verdere bijzonderheden zij verwezen naar Hoofdstuk II.

Fig IV.1 geeft de toename weer van de oplading van transferrine met Fe (II) resp (III).

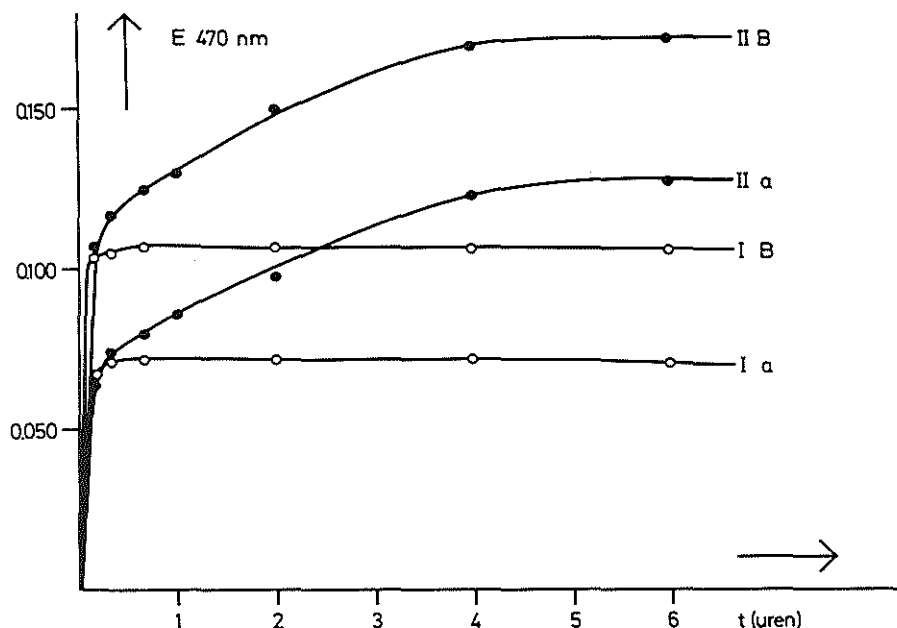


Fig IV.1.

De toename van de extinctie bij 470 nm en de bijeenvoeging van Fe (II) en Fe (III) in aanwezigheid van transferrine in verband met de snelheid van opladen van transferrine met een Fe (II) zout of een Fe (III) zout.

I) A 0,045 μmol Fe (II) toegevoegd aan 0,030 μmol transferrine.

B 0,120 μmol Fe (II) toegevoegd aan 0,080 μmol transferrine.

II) A 0,060 μmol Fe (III) toegevoegd aan 0,045 μmol transferrine.

B 0,120 μmol Fe (III) toegevoegd aan 0,045 μmol transferrine.

Duidelijk komt hier naar voren, dat de toevoeging van Fe (II) aan transferrine veel sneller tot een maximale extinctie bij 470 nm leidt dan toevoeging van Fe (III). Zoals reeds eerder door ons gesteld werd, wilden wij die methode verkiezen, die het snelst tot een maximale oplading van transferrine met Fe leidde. Een Fe (II) oplossing bleek dus de aangewezen weg te zijn. Met behulp van bovenstaande methodiek van oplading zijn ultrafiltratie- en dialyse experimenten verricht, waarmee de hoeveelheid niet aan transferrine gebonden Fe werd bepaald.

§ 2 De ontwikkeling van de ultrafiltratie - opzet.

Evenals met dialyse is het met ultrafiltratie mogelijk een in-

druk te verkrijgen omtrent de ligging van het evenwicht in het Fe - transferrine systeem door de bepaling van het niet aan transferrine gebonden ultrafiltreerbaar Fe. Uiteraard is niet van te voren te overzien in hoeverre het dialyseerbaar Fe identiek zal zijn met het ultrafiltreerbaar Fe. Weliswaar is bij een systeem,

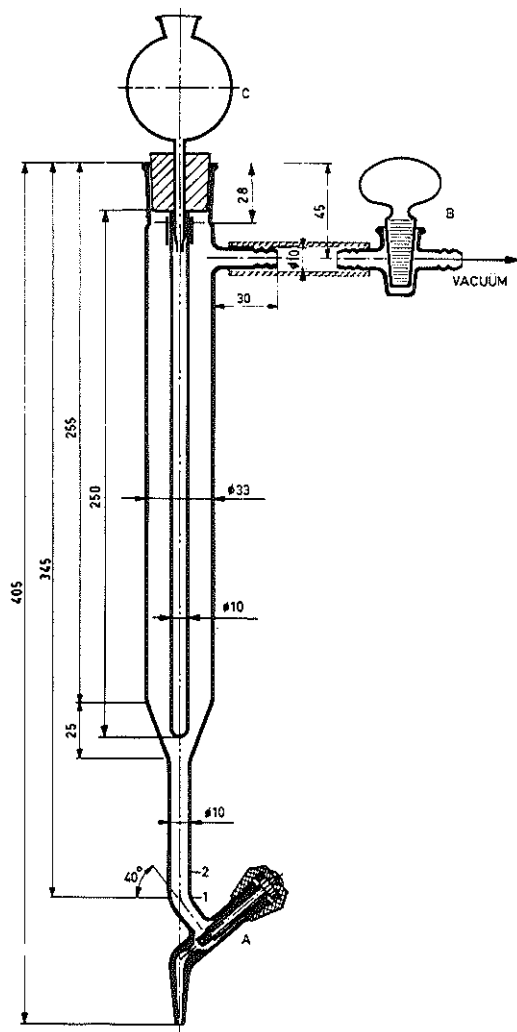


Fig IV.2.

De bij de in vitro experimenten toegepaste ultrafiltratie-opzet.
Zie voor bijzonderheden de tekst.

dat alleen bestaat uit transferrine en Fe, de verwachting gewettigd, dat er een goede correlatie bestaat, maar bij toevoeging van eiwitten en andere stoffen aan het Fe-transferrine systeem en zeker bij proeven met plasma, is dit allerm minst zeker. Bij onze ultrafiltratie - opzet heeft een ultrafiltraat een relatief klein volume ten opzichte van de te ultrafiltreren vloeistof. Hiermede zal evenals bij de door ons gekozen dialyse - opzet bereikt worden, dat het evenwicht tussen transferrine en Fe zo weinig mogelijk zal verschuiven. Fig IV.2 geeft schematisch de ultrafiltratie - opzet weer.

Voor de ultrafiltratie werd Visking 8/32 dialyseslang gebruikt. De ultrafiltratie vond als volgt plaats: De dialyseslang werd bevestigd aan kolf C. Over de dialyseslang werd een plastic slang geschoven, teneinde te voorkomen, dat de slang tijdens de ultrafiltratie van de kolf wordt verwijderd. De dialyseslang werd daarna gevuld met de desbetreffende oplossing. Kraan A werd gesloten, daarna werd vacuüm gezogen. Nadat het vacuüm was bereikt, werd kraan B gesloten en gedurende 15 - 20 minuten werd het vacuüm gehandhaafd totdat zich in D 1 ml ultrafiltraat verzameld had. Een nadeel van de ultrafiltratie - opzet in vergelijking met de dialyse - opzet is, dat met de eerste moeilijk onder anaerobe omstandigheden kan worden gewerkt.

De navolgende experimenten zijn verricht teneinde de ultrafiltratie - opzet te toetsen: Aan 25,0 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd 0,40 ml natriumbicarbonaat (conc. 1 mol/l) toegevoegd. Vanuit een oplossing van ascorbinezuur (75 mmol/l) en een oplossing van Fe (II) (conc. 1,0 mmol/l) werden hoeveelheden ascorbinezuur resp Fe (II) toegevoegd, zodat de eindconcentraties werden verkregen, die vermeld staan in tabel IV.1. Aan de mengsels werd 0,1 μC ^{59}Fe (II) toegevoegd. Als voorbeeld van de werkwijze wordt experiment 1 in tabel IV.1 nader toegelicht.

Aan 25,0 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l pH 7,4 werd achtereenvolgens toegevoegd 0,1 ml ascorbinezuur (conc. 75 mmol/l), 0,35 ml Fe (II) (conc. 1,0 mmol/l) en 0,1 μC ^{59}Fe (II). Van het reactiemengsel werd alvorens het in de dialyseslang werd gebracht 1,0 ml genomen en hierin werd de ^{59}Fe radioactiviteit bepaald. Vervolgens werd het mengsel gedurende 20 minuten geultrafiltreerd totdat ongeveer 1 ml ultrafiltraat was verkregen. De ^{59}Fe radioactiviteit in 1 ml van de te ultrafiltreren vloeistof en in 1 ml ultrafiltraat werd bepaald. Uit bovenstaande getallen werd het rendement berekend door de verhouding van de ^{59}Fe concentratie in het ultrafiltraat ten opzichte van de ^{59}Fe concentratie van het reactiemengsel te vermenigvuldigen met 100. In plaats van het rendement te bepalen met ^{59}Fe kan eveneens met behulp van de in hoofdstuk II beschreven che-

mische macro- en zo nodig micro-techniek de hoeveelheid Fe bepaald worden in het ultrafiltraat en in de te ultrafiltreren vloeistof en hieruit kan dan het rendement berekend worden. De werkwijze is identiek met die toegepast bij de bepaling van het rendement met behulp van ^{59}Fe . De verkregen waarden van het rendement verkregen met behulp van beide bepalingstechnieken werden gemiddeld vanwege de grote overeenkomst.

Eenzelfde serie experimenten werd verricht met een fosfaatbuffer van dezelfde samenstelling als beschreven maar waarin het Fe werd vervangen door glucose. Tabel IV.1 geeft de waarden van het rendement weer gemeten bij verschillende Fe en ascorbinezuur concentraties. Eveneens zijn de waarden voor het rendement voor natrium opgenomen. Het rendement van natriumionen werd berekend met behulp van het aanwezige natrium in de fosfaatbuffer.

Tabel IV.1.

Rendement voor Fe, glucose en natrium in aanwezigheid van ascorbinezuur bij ultrafiltratie.

Experiment	[Fe] ($\mu\text{mol/l}$)	Ascorbinezuur (mmol/l)	Glucose (mmol/l)	Na^+ (mmol/l)	R (%)
1	14,0	0,3	—	—	80
2	18,0	0,3	—	—	85
3	15,0	0,3	—	—	84
4	3,6	0,3	—	—	85
5	18,0	0,3	—	—	79
6	18,0	0,6	—	—	81
7	3,6	0,6	—	—	78
8	3,6	6,0	—	—	76
9	14,0	6,0	—	—	78
10	2,0	3,0	—	—	81
11	—	0,3	3,9	—	97
12	—	0,3	5,5	—	105
13	—	0,3	7,2	—	97
14	—	0,3	—	72	96
15	—	0,3	—	70	97
16	—	0,3	—	69	101

Wordt het Fe vervangen door glucose dan wordt, zoals de experimenten 11, 12 en 13 weergeven, een rendement gevonden van 97-105%. Voor natrium wordt ongeveer eenzelfde rendement gevonden.

Bovenstaande tabel brengt de vraag naar voren, wat de oorzaak is van het feit, dat het rendement met Fe ongeveer 20% lager is dan met glucose en natrium. Glaser stelde vast bij zijn dialyseexperimenten, waarbij ascorbinezuur werd toegevoegd en waarbij dus de aanwezigheid van Fe (II) ionen aanwe-

zig mocht worden verondersteld, dat het Fe onverwacht langzaam door de dialysemembraan diffundeerde. Bij Fe (II) ionen verwacht men een dialysetijd in zijn proefopstelling van slechts enkele uren inplaats van 48 uur door hem gemeten. De verwachting van een dialysetijd van slechts enkele uren of zelfs korter komt overeen met de ervaring verkregen met de dialyse-opzet van de autoanalyzer van Technicon met ionen als Na, K en Ca.

In hoofdstuk III bleek dat onder aerobe omstandigheden bij ijzer in aanwezigheid van ascorbinezuur slechts zeer gedeeltelijk in de vorm van Fe (II) ionen aanwezig is. Wij zetten uiteen dat een gedeelte van het Fe waarschijnlijk als Fe (III)-ascorbinezuur complex voorkomt. Teneinde de niet aan transferrine gebonden ijzerconcentratie door middel van ultrafiltratie te kunnen bepalen, is het noodzakelijk enig inzicht te hebben in de oorzaak van het gevonden rendement van 80%. Een mogelijke verklaring is, dat er een Fe (III)-ascorbinezuur complex of een ander hoog molecuulair agglomeraat bestaat, dat niet door de membraan diffundeert. Deze mogelijkheid kan getoetst worden door hetzelfde mengsel van Fe en ascorbinezuur meerdere malen aan ultrafiltratie te onderwerpen. Het ultrafiltraat van 1,0 ml wordt dan na elke ultrafiltratie vergeleken met de te ultrafiltreren vloeistof, waarvan voor en na ultrafiltratie in 1,0 ml de ^{59}Fe radioactiviteit wordt bepaald. De proefomstandigheden waren identiek met die van experiment 7 (tabel IV.1). Het blijkt dat na elke ultrafiltratie de Fe concentratie toeneemt zowel in het ultrafiltraat als in de te ultrafiltreren vloeistof. Tabel IV.2 geeft een overzicht van de gevonden waarden. Het rendement werd gemeten met behulp van ^{59}Fe bepalingen en berekend zoals eerder in deze paragraaf beschreven.

Tabel IV.2.

Het rendement bij 4 opeenvolgende ultrafiltraties voor Fe in aanwezigheid van ascorbinezuur.

Rangnummer ultrafiltratie	Reactiemengsel ^{59}Fe (cpm)	Ultrafiltraat ^{59}Fe (cpm)	R (%)
1	2792	2230	80
2	2883	2397	83
3	2946	2472	84
4	3063	2560	84

Uit bovenstaande gegevens is af te leiden vanwege het vrijwel constant blijven van R over de achtereenvolgende ultrafiltraten, dat de reeds eerder genoemde veronderstelling niet juist kan zijn. Het rendement van 80% moet dus een gevolg zijn

van het feit, dat het ijzer in ionvorm hetzij in de vorm van Fe (III) - ascorbinezuur complexen de membraan langzamer passeert dan de H_2O moleculen. Er bestaat duidelijk een constante verhouding tussen de snelheid waarmee de water-, glucose- en natriummoleculen de membraan passeren en de snelheid waarmee dat met Fe plaatsvindt.

Tengevolge van de goede reproduceerbaarheid van de R-waarden is bovenstaande ultrafiltratie bruikbaar mits gecorrigeerd wordt voor het rendement. In de volgende paragrafen zal met behulp van bovenstaande techniek nader ingegaan worden op de hoeveelheid Fe, die niet gebonden is aan transferrine in diverse proefopzetten.

§ 3 Bepaling met behulp van de ultrafiltratie - opzet van het niet aan transferrine gebonden ijzer tijdens de oplading van transferrine met Fe.

Het transferrine werd opgeladen met Fe (II) zoals beschreven in paragraaf 2 van dit hoofdstuk. De proefomstandigheden waren als volgt: Aan 20,0 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l pH 7,4 werd 0,30 ml natriumbicarbonaat (conc. 1 mol/l) en 0,60 ml ascorbinezuur (conc. 85 mmol/l) toegevoegd. Vervolgens werd 0,50 ml transferrine (conc. 0,80 mmol/l) en 0,5 ml Fe (II) (conc. 0,72 mmol/l) gemerkt met $1 \mu C$ ^{59}Fe toegevoegd. Het verzaadigingspercentage zou 45% bedragen als alle transferrine gebonden zou zijn. Bovenstaand mengsel werd op verschillende tijdstippen na het bijeenvoegen van de reagentia geultrafiltreerd. Bij het eerste experiment werd direct na toevoeging van het ijzer het mengsel geultrafiltreerd. De gehele ultrafiltratie duurt ongeveer 20 minuten. Tijdens de ultrafiltratie vond eveneens oplading van het transferrine aan ijzer plaats. Hiervoor moet een correctie worden aangebracht. De wijze waarop wij dit deden is weergegeven in het navolgende voorbeeld van experiment 1 in tabel IV.3. De proefomstandigheden in het experiment wat betreft concentraties etc. waren dezelfde zoals ze in het begin van deze paragraaf door ons opgesteld waren. De ^{59}Fe radioactiviteit in het reactiemengsel per ml bedroeg vóór de ultrafiltratie 103.000 cpm. Nadat na 20 minuten 1,0 ml ultrafiltraat gevormd was, werd zowel de ^{59}Fe radioactiviteit in het ultrafiltraat als in het reactiemengsel gemeten. De ^{59}Fe radioactiviteit in het ultrafiltraat per ml bedroeg 5000 cpm en die in het reactiemengsel 107.000 cpm per ml. Het rendement van een blanco experiment waaraan geen transferrine was toegevoegd bedroeg 80%. De berekening van het niet aan transferrine gebonden Fe vond nu als volgt plaats: De ^{59}Fe concentratie in het ultrafiltraat ten opzichte van de ^{59}Fe con-

concentratie in het reactiemengsel werd vermenigvuldigd met 100. Voor bovenstaande getalwaarde bedraagt het percentage "vrij" Fe 6,2%, waarbij de correctie voor het rendement in acht is genomen. Tijdens de 20 minuten durende ultrafiltratie gaat de oplading van transferrine met ijzer door. Het lijkt daarom voor de hand te liggen als "duur van de oplading" het tijdsverloop te kiezen tussen het bijeenvoegen van ijzer en transferrine en het tijdstip waarop de ultrafiltratie wordt beëindigd. Hiertegen pleit echter dat tijdens de ultrafiltratie, door genoemde oplading, het percentage vrij ijzer daalt. De concentratie ijzer in het ultrafiltraat daalt tijdens de 20 minuten durende ultrafiltratie dus eveneens. De gevonden ijzerconcentratie in de 1 ml ultrafiltraat verzameld in 20 minuten is dus geen maat voor de concentratie vrij ijzer op het moment dat de ultrafiltratie wordt beëindigd. Indien het percentage vrij ijzer gedurende de ultrafiltratie gelijkmatig zou dalen, dan zou de gevonden concentratie ijzer in de 1 ml ultrafiltraat, de maat zijn voor het percentage vrij ijzer op het moment dat de ultrafiltratie halverwege was, dus 10 minuten geduurd had. Het ligt dan voor de hand als "duur van de oplading" het tijdsverloop te kiezen tussen het tijdstip van bijeenvoegen van ijzer en transferrine en het tijdstip halverwege de ultrafiltratie, dus 10 minuten na het begin ervan. Uit de proeven van Glaser is duidelijk dat de snelheid van oplading van transferrine met ijzer in de tijd afneemt. Eigenlijk zou dus niet 10 minuten moeten worden gekozen, maar een korter tijdsverloop. Bij gebrek aan exacte gegevens hieromtrent leek het ons juist de correctie op 10 minuten te stellen. Als "duur van oplading" beschouwen zij dus het tijdsverloop tussen het tijdstip van bijeenvoegen van ijzer en transferrine en het tijdstip dat de ultrafiltratie halverwege is.

Tabel IV.3.

Het percentage niet aan transferrine gebonden Fe in aanwezigheid van HCO_3^- (15 mmol/l) bij verschillende tijden van oplading. De oplossing bevatte 0,40 μmol transferrine en 0,36 μmol Fe (II). Zie voor verdere bijzonderheden de tekst.

Experiment	Duur van oplading (min)	"vrij" ijzer (%)
1	10	6,3
2	45	1,2
3	60	0,7
4	120	0,5
5	180	0,5
6	240	0,5
7	360	0,5

Als beschreven in bovenstaand voorbeeld werden ook experimenten verricht na 45 minuten, 1 uur, 2 uur, 3 uur en 6 uur. Tabel IV.3 geeft een overzicht van de gevonden waarden voor het Fe dat niet aan transferrine gebonden is na verschillende opladingstijden.

Uit bovenstaande tabel kan geconcludeerd worden, dat minstens 2 uur incubatie vereist is alvorens de evenwichtssituatie is bereikt. Fig IV.1 geeft eveneens een aanwijzing, dat het evenwicht tussen transferrine en ijzer een vrij lange tijd nodig heeft om zich in te stellen. De meting van de extinctie bij 470 nm geeft echter minder nauwkeurige inlichtingen op dit punt dan bij ultrafiltratieproeven. Bij alle volgende experimenten is een incubatieperiode aangehouden van 2 uur alvorens aangevangen werd met de bepaling van het niet aan transferrine gebonden Fe.

§ 4 *Ultrafiltratieexperimenten met een oplopende Fe/transferrine verhouding.*

In hoeverre de saturatiegraad van belang is bij de hoeveelheid Fe gevonden in het ultrafiltraat, werd door ons nagegaan door het transferrine bij verschillende "saturatiegraden" variërend van 20 tot 80% te ultrafiltreren en daarna de hoeveelheid ^{59}Fe in het ultrafiltraat te bepalen. De technische details zijn beschreven in de paragrafen 1 en 2 van dit hoofdstuk. De hoeveelheid transferrine werd constant gehouden, terwijl de hoeveelheid toegevoegde Fe varieerde. De experimenten werden als volgt verricht: Aan 20 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd 0,20 ml ascorbinezuur (conc. 250 mmol/l), 1,00 ml natriumbicarbonaat (conc. 0,5 mol/l) toegevoegd. Vervolgens werd aan de vier reactiemengsels transferrine (conc. 0,88 mmol/l), Fe (II) (conc. 1,0 mol/l) en 2 μC ^{59}Fe (II) toegevoegd. Eindconcentraties staan vermeld in tabel IV.4. Het geheel werd 2 uur geïncubeerd bij 20°C. Direct hierna werden de bovenstaande mengsels geultrafiltreerd en werd de hoeveelheid ^{59}Fe in het ultrafiltraat bepaald. De gevonden waarden werden zoals gebruikelijk gecorrigeerd voor het rendement, gevonden met behulp van een blanco experiment zonder transferrine toevoeging. De resultaten zijn weergegeven in tabel IV.4.

Uit tabel IV.4 blijkt duidelijk dat, naarmate de verzadigingsgraad stijgt, de hoeveelheid Fe, die niet gebonden werd aan transferrine, toeneemt.

Op de rol van natriumbicarbonaat werd reeds gewezen in hoofdstuk II paragraaf 4. Bovenstaande ultrafiltratie proefopzet leent zich niet goed om de invloed van natriumbicarbonaat te

Tabel IV.4.

Het percentage niet aan transferrine gebonden Fe bij verschillende "saturatiegraden". Zie voor andere bijzonderheden de tekst.

Experiment	[Fe] ($\mu\text{mol/l}$)	[Transferrine] ($\mu\text{mol/l}$)	"Saturatie" (%)	"vrij" Fe (%)
1	10,0	26,0	19	0,10
2	17,0	25,8	33	0,25
3	27,5	25,6	54	0,50
4	41,7	25,2	83	1,80

bestuderen, daar er onder de genoemde proefomstandigheden niet verhinderd kan worden dat er CO_2 uit de lucht in het reactiemengsel zal oplossen. Wel kan berekend worden wat de $[\text{HCO}_3^-]$ onder de gegeven proefomstandigheden zal zijn, en wel met onderstaande vergelijking (49):

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{Q \times p\text{CO}_2}$$

hierin is Q de oplosbaarheidsconstante, $p\text{CO}_2$ de partiële druk van CO_2 in lucht en K een constante. Bij een pH van 7,4 een $p\text{CO}_2$ van $0,04 \times 10^{-2}$ en een pK van 6,15 en een Q van 0,0383 is een $[\text{HCO}_3^-]$ concentratie $300 \mu\text{mol/l}$. Bij ultrafiltratie onder bovengenoemde omstandigheden kan de oplading van transferrine door ijzer dus niet bestudeerd worden bij bicarbonaat concentraties lager dan $300 \mu\text{mol/l}$, maar wel kan de invloed nagegaan worden zonder extra natriumbicarbonaat toevoeging. In een glazen buis met een volume van ongeveer 26 ml werd 25,0 fosfaatbuffer gepipetteerd. Vervolgens werd 0,8 ml ascorbinezuur (conc. 85 mmol/l) en 0,50 ml transferrine (conc. 0,79 mmol/l) Fe (II) (conc. 1,65 mmol/l) en $2 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$ (II) toegevoegd. Eindconcentraties staan vermeld in tabel IV.5. Wanneer al het Fe aan transferrine gebonden zou zijn, dan zouden de saturatiegraden in bovenstaand mengsel 31%, 51% en 73% bedragen. De glazen buis werd afgesloten van de buitenlucht door middel van een glazen stop. Na 1 uur, na 2 uur en na 18 uur staan werd door middel van ultrafiltratie het niet aan transferrine gebonden Fe bepaald met behulp van ^{59}Fe radioactiviteitsmetingen. De gevonden percentages "vrij" Fe zijn vermeld in tabel IV.5. Correctie voor het rendement vond plaats.

Wanneer men bovenstaande tabel IV.5, waarbij aan de experimenten geen extra natriumbicarbonaat werd toegevoegd, vergelijkt met tabel IV.3, dan ziet men duidelijk dat de invloed van natriumbicarbonaat belangrijk is in verband met de snelheid van

Tabel IV.5.

Het percentage niet aan transferrine gebonden Fe bij verschillende tijden van oplading zonder extra HCO_3^- toevoeging.

Experiment	[Fe] ($\mu\text{mol/l}$)	[Transferrine] ($\mu\text{mol/l}$)	Duur van de oplading (uren)	"vrij" Fe (%)
1	9,4	15,1	1	7,6
2	15,0	15,1	1	8,8
3	22,0	15,0	1	15,2
4	15,0	15,1	2	8,5
5	22,0	15,0	2	13,4
6	9,4	15,1	18	2,5
7	15,0	15,1	18	3,0

opladen. Bovendien blijkt, dat na een incubatie van 18 uur slechts een gering percentage niet aan transferrine gebonden Fe aanwezig is. In hoeverre natriumbicarbonaat onmisbaar is bij de oplading is niet met zekerheid te zeggen vanwege de hoeveelheid opgelost CO_2 in de fosfaatbuffer, waardoor de HCO_3^- concentratie nog altijd 0,3 mmol/l bedraagt. In paragraaf 8 van dit hoofdstuk zal in een meer geschikte proef-opzet de functie van het bicarbonaat onderzocht worden. Hierbij zal gestreefd worden naar volledige uitsluiting van natriumbicarbonaat in het systeem.

In hoeverre de ascorbinezuurconcentratie van invloed is bij de oplading van Fe en transferrine werd als volgt nagegaan: Aan 20,0 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd vanuit een oplossing van ascorbinezuur (conc. 60 mmol/l) de vereiste hoeveelheid toegevoegd. Vervolgens werd 0,30 ml natriumbicarbonaat (conc. 1 mol/l), 0,39 μmol transferrine (conc. 0,30 mmol/l) en 0,36 μmol Fe (II) gemerkt met 0,1 μC ^{59}Fe (II) in het reactievat gepipetteerd. De verzadigingsgraad zou 46% bedragen, als al het Fe aan transferrine zou zijn gebonden. De incubatietijd bedroeg 3 uur. Direct daarna vond ultrafiltratie plaats. Tabel IV.6 geeft het niet aan transferrine gebonden ^{59}Fe weer bij verschillende ascorbinezuur concentraties.

Tabel IV.6.

De invloed van ascorbinezuur op het percentage niet aan transferrine gebonden Fe. Het mengsel bevat 0,39 μmol transferrine en 0,36 μmol Fe (II), de incubatietijd bedroeg 2 uur.

Experiment	[Ascorbinezuur] (mmol/l)	"vrij" Fe (%)
1	0,6	0,60
2	3,0	0,57
3	6,0	0,55
4	7,5	0,54

Uit tabel IV.6 blijkt duidelijk, dat de ascorbinezuurconcentratie weinig invloed heeft op het percentage niet aan transferrine gebonden Fe.

§ 5 De ontwikkeling van de dialyse - opzet.

Zoals reeds in de inleiding werd vermeld, werd naast ultrafiltratie de methode van dialyse toegepast. De ultrafiltratie bleek nl. niet erg geschikt om toegepast te worden bij in vivo experimenten, dit in tegenstelling tot de dialyse techniek. Het was dus voor ons noodzakelijk in vitro experimenten met behulp van dialyse te verrichten. In deze paragraaf en de volgende zal nader worden ingegaan op de methode van dialyse, toegepast om het niet aan transferrine gebonden Fe te bepalen. Hierbij zullen wij nagaan aan welke eisen de dialyse - opzet moet voldoen. Deze voorwaarden zijn onder meer de tijdsduur voor het bereiken van evenwicht en de invloed van eiwit met betrekking tot de absorptie van Fe aan eiwit.

We hadden voor het dialyse membraan de keuze tussen Visking (8/32) en Cuprophane. Uit de resultaten, verkregen door middel van de ultrafiltratie, bleek verder dat de hoeveelheid Fe niet aan transferrine gebonden ongeveer 10^{-7} tot 10^{-6} mol/l bedroeg. Uitgaande van bovenstaande gegevens, werd nagegaan hoe het dialysepatroon zich gedroeg bij een Fe concentratie van 10^{-7} mol/l, wanneer experimenten verricht werden met zowel Visking als Cuprophane membranen. De experimenten werden als volgt verricht: Aan 500 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd 0,250 g ascorbinezuur (eindconc. 3 mmol/l) en 0,6 g natriumbicarbonaat (eindconc. 15 mmol/l) toegevoegd. De Fe concentratie van het mengsel bedroeg 10^{-7} mol/l en werd bereikt door 0,25 ml Fe (II) (conc. 0,2 mmol/l) gemerkt met $1\mu\text{C}$ ^{59}Fe toe te voegen. Uit bovenstaand mengsel werd vervolgens 12 maal 25 ml gepipetteerd in erlenmeyers van 50 ml. De inhoud van deze erlenmeyers werden afzonderlijk gedialyseerd tegen 1,0 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4), waaraan was toegevoegd ascorbinezuur (3 mmol/l) en natriumbicarbonaat (15 mmol/l). Als dialysemateriaal werd 6 maal Cuprophane gebruikt en 6 maal Visking. Op bepaalde tijdstippen werd de ^{59}Fe concentratie in de dialysezak gemeten. Fig IV.3 geeft de snelheid van het tot stand komen van evenwicht weer. Tevens is in Fig IV.3 het dialysepatroon weergegeven bij een Fe concentratie van 10^{-5} mol/l met als dialysemateriaal Cuprophane.

Uit fig IV.3 blijkt, dat Cuprophane een geschikter materiaal is dan Visking met betrekking tot het tot stand komen van het evenwicht. Wij kozen daarom voor de verdere proeven Cuprophane.

Bovendien blijkt, dat bij verhoging van de concentratie van 10^{-7} mol/l tot 10^{-6} mol/l, de tijd voor het bereiken van evenwicht toeneemt. In ieder geval is er bij beide concentraties evenwicht bereikt na 5 uur. Deze dialysetijd werd gekozen.

§ 6 De invloed van eiwit bij dialyse experimenten.

Daar bij in vivo experimenten het eventuele niet aan transferrine gebonden Fe zich misschien kan hechten aan eiwit, werd met onze dialyse - opzet de invloed van albumine en gamma globuline in vitro nagegaan. Hiertoe werd aan fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) ascorbinezuur (eindconc. 3 mmol/l) en natriumbicarbonaat (eindconc. 15 mmol/l) en 0,5 ml Fe (II) (conc. 1,0 mmol/l) gemerkt met $1,0 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$ toegevoegd. De methode van bereiding van bovenstaand mengsel was identiek met die zoals beschreven in paragraaf 5. Van bovenstaand mengsel werd 25

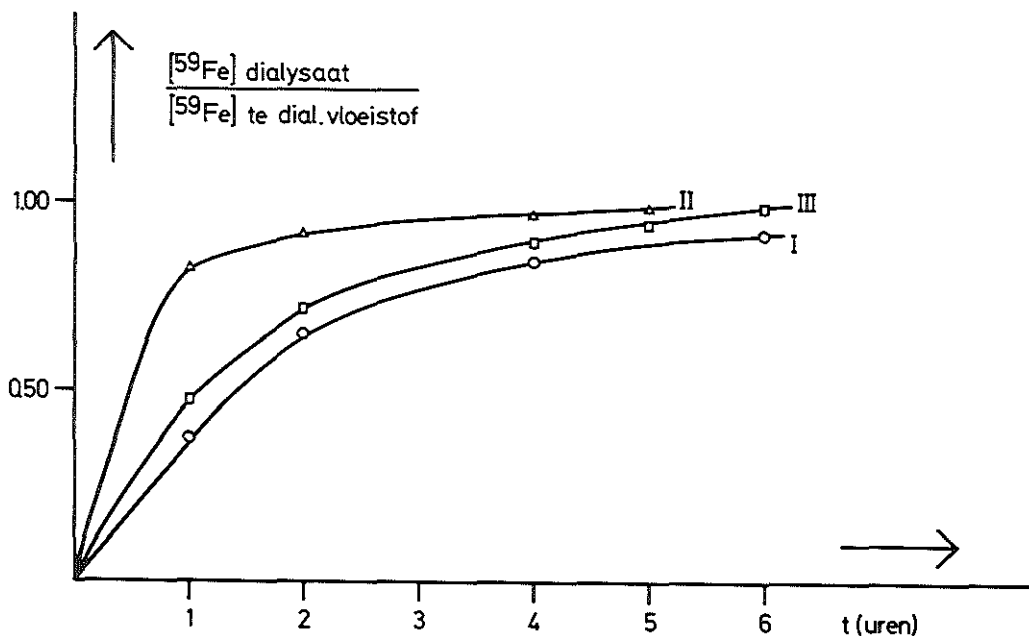


Fig IV.3.

Dialysepatoon van ijzer in fosfaatbuffer (0,05 mol/l) in aanwezigheid van ascorbinezuur en natriumbicarbonaat. Ijzer in de buitenvloeistof.

- I) $[\text{Fe}] = 10^{-7}$ mol/l Dialysemateriaal Visking.
- II) $[\text{Fe}] = 10^{-7}$ mol/l Dialysemateriaal Cuprophan.
- III) $[\text{Fe}] = 10^{-5}$ mol/l Dialysemateriaal Cuprophan.

ml gepipetteerd. Gedialyseerd werd tegen 1,2 ml albumine (50 g/l) opgelost in fosfaatbuffer, waaraan ascorbinezuur (eindconc. 3 mmol/l) en natriumbicarbonaat (eindconc. 15 mmol/l) was toegevoegd. Na 5 uur werd de toename van de ^{59}Fe radioactiviteit gemeten in het dialysaat. Uit de eerder weergegeven proeven (fig. IV.3) volgt dat zonder albumine de verhouding $[\text{Fe}]/\text{dialysaat}/[\text{Fe}]/\text{buitenvloeistof}$ na ongeveer 5 uur 0,95 is. Bij de aanwezigheid van albumine in het dialysaat blijkt deze verhouding ongeveer 6 te zijn in bovengenoemde proefopzet. Ongeveer 16% van het totaal aanwezige ijzer bindt zich dan aan het albumine. Uit bovenstaande resultaten moet geconcludeerd worden dat bij in vivo experimenten de binding van Fe aan albumine een complicerende factor zal vormen. Teneinde na te gaan in hoeverre aan albumine gehecht ijzer via de dialysemembraan uitwisselt, zijn de volgende proeven verricht: Aan 40,0 ml albumine oplossing (50 g/l) in fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd 0,40 ml ascorbinezuur (conc. 0,25 mol/l) en 1,00 ml natriumbicarbonaat (conc. 1 mol/l) toegevoegd. Vervolgens werd 0,4 ml Fe (II) (conc. 0,2 mmol/l) en 0,05 μC ^{59}Fe toegevoegd. Deze oplossing werd verdeeld over twee erlenmeyers van 50 ml. De dialyse vond plaats tegen 1,5 ml albumine oplossing (50 g/l) in fosfaatbuffer. De albumine oplossing waartegen gedialyseerd werd, bevatte ascorbinezuur, natriumbicarbonaat en Fe (II) in dezelfde concentraties als de buitenvloeistof, ^{59}Fe was alleen in de buitenvloeistof aanwezig. Nagegaan werd nu de toename van de ^{59}Fe radioactiviteit in het dialysaat na 5 uur dialyse. Tabel IV.7 geeft de resultaten weer.

Tabel IV.7.

Experimenten waarbij de dialysesnelheid van Fe via een membraan tussen twee oplossingen, die albumine bevatten, werd bestudeerd.

Experiment	Duur (uren)	Buitenvloeistof ^{59}Fe (cpm)		Binnenvloeistof ^{59}Fe (cpm)	
		begin	eind	begin	eind
1	5	840	808	0	790
2	5	850	815	0	805

Uit bovenstaande gegevens blijkt, dat wanneer de dialyse plaats vindt vanuit een eiwit - tegen een eiwitoplossing er na 5 uur 98% - 99% evenwicht is ontstaan. Uit fig IV.2 blijkt dat de dialysesnelheid door de aanwezigheid van eiwit in ieder geval niet verlaagd is. De invloed van de hechting van Fe aan plasma eiwitten, die vooral in de later te bespreken in vitro en in vivo

experimenten optreden, kan dus inderdaad teniet gedaan worden door de dialyse te verrichten tegen een eiwitoplossing.

§ 7 *Resultaten betreffende het niet aan transferrine gebonden Fe verkregen met de in vitro dialyse - opzet met transferrine en konijnen - en humaan plasma.*

De dialyse experimenten werden als volgt verricht: Aan 20,0 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd 0,20 ml ascorbinezuur (conc. 0,25 mol/l), 0,60 ml natriumbicarbonaat (0,5 mol/l) toegevoegd. Vervolgens werd aan 4 mengsels zoals bovengenoemd transferrine (conc. 0,88 mmol/l) en Fe (II) (conc. 1,0 mmol/l) en 2,0 μC ^{59}Fe (II) aan het reactiemengsel toegevoegd. De eindconcentraties van Fe en transferrine staan vermeld in tabel IV.8. Het geheel werd 2 uur bij 20°C geïncubeerd. Vervolgens werden de oplossingen gedialyseerd tegen 1,2 ml fosfaatbuffer waarin zich ascorbinezuur (eindconc. 3 mmol/l) en natriumbicarbonaat (eindconc. 15 mmol/l) bevond. De dialyse vond plaats tegen fosfaatbuffer, daar er geen andere eiwitten dan transferrine in de oplossing voorkwamen.

Na 5 uur dialyse werd de ^{59}Fe radioactiviteit gemeten en vervolgens werd het percentage niet aan transferrine gebonden Fe berekend. Eveneens werd getracht de hoeveelheid Fe in de dialysezak chemisch te bepalen en daaruit het percentage niet aan transferrine gebonden Fe te berekenen. Het was voor ons met de bestaande micro techniek niet mogelijk om op chemische wijze een Fe concentratie lager dan 0,2 $\mu\text{mol/l}$ aan te tonen. Tabel IV.8 geeft de resultaten weer verkregen bij dialyse van een Fe-transferrine oplossing bij oplopende Fe-transferrine verhoudingen.

Tabel IV.8.

Het percentage niet aan transferrine gebonden Fe bij verschillende saturatiegraden. Zie voor bijzonderheden de tekst.

Experiment	Fe ($\mu\text{mol/l}$)	Transferrine ($\mu\text{mol/l}$)	"Saturatie" (%)	Niet aan transferrine gebonden Fe ^{59}Fe bep.	chem. bep.
1	8,8	26,0	17	0,1	—
2	16,8	25,8	33	0,3	—
3	27,3	25,6	53	0,5	0,7
4	41,5	25,2	82	1,8	1,7

Er blijkt een goede overeenkomst te zijn tussen de resultaten verkregen met ultrafiltratie (paragraaf 4 van dit hoofdstuk) en de resultaten verkregen met behulp van dialyse experimenten.

Vervolgens werden in vitro dialyse proeven verricht met konijnenplasma en humaanplasma. Het bloed van konijnen werd verkregen door middel van een hartpunctie en bij de mens via een venapunctie en werd vervolgens onstolbaar gemaakt met heparine. Na het afdraaien van de erythrocyten werd het plasma gecontroleerd op de aanwezigheid van haemoglobine (50). Werd een concentratie van haemoglobine in het plasma gevonden groter dan $0,2 \mu\text{mol/l}$, dan kwam het plasma niet in aanmerking. Door toevoeging van Fe (II) werd het plasma op een hogere saturatiegraad gebracht, teneinde na te gaan in hoeverre de saturatiegraad van belang was bij het aantonen van niet aan transferrine gebonden Fe.

De experimenten werden als volgt verricht: Aan $25,0 \text{ ml}$ plasma werd $0,30 \text{ ml}$ ascorbinezuur (conc. $0,25 \text{ mol/l}$), Fe (II) (conc. $1,0 \text{ mmol/l}$) en $3,0 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$ (II) toegevoegd. Eindconcentraties staan vermeld in tabel IV.9. De incubatieperiode bedroeg 2 uur, 6 uur, 12 uur en 17 uur. Gedialyseerd werd tegen $1,2 \text{ ml}$ albumineoplossing (50 g/l) in fosfaatbuffer, waaraan was toegevoegd ascorbinezuur (eindconc. 3 mmol/l) en natriumbicarbonaat (eindconc. 15 mmol/l). Uit de albumineoplossing was van te voren het Fe verwijderd door de oplossing te dialyseren op dezelfde wijze zoals wij in hoofdstuk II het Fe uit een transferrine oplossing verwijderden. De resultaten van bovengenoemde experimenten worden weergegeven in tabel IV.9.

Tabel IV.9.

Het percentage niet aan transferrine gebonden Fe in konijnen- en humaan plasma.

Exp.	Fe ($\mu\text{mol/l}$) aanwezig	Fe ($\mu\text{mol/l}$) na toevoeging Fe	TYBC ($\mu\text{mol/l}$)	"Saturatie" (%)	Incubatie (uren)	Dialyse (uren)	"vrij" Fe (%)
1 ^x	26	26	58	45	2	5	0,4
2 ^x	20	32	52	62	2	5	0,5
3 ^x	20	32	52	62	17	5	0,4
4	35	53	60	89	2	4	0,8
5	35	53	60	89	2	$5\frac{1}{2}$	0,9
6	35	53	60	89	6	6	0,6
7	35	53	60	89	12	6	0,7

* De experimenten 1, 2 en 3 werden met humaan plasma, de experimenten 4, 5, 6 en 7 met konijnenplasma verricht.

Uit tabel IV.9 blijkt duidelijk, dat er een aantoonbare hoeveelheid Fe in het dialysaat aanwezig is. Het gevonden percentage blijkt bovendien weinig afhankelijk van de incubatieduur te zijn.

Een volgende reeks proeven werd verricht met plasma ver-

kregen bij een konijn waaraan van tevoren plasma gemerkt met ^{59}Fe intraveneus was ingebracht. Deze experimenten vonden als volgt plaats: Aan 6,0 ml konijnenplasma werd 0,2 ml ascorbinezuur (conc. 0,1 mol/l) en 0,12 ml natriumbicarbonaat (1 mol/l) toegevoegd. Natriumbicarbonaat werd extra toegevoegd om te voorkomen, dat het bicarbonaat gehalte te laag zou worden daar het plasma gedurende een nacht geïncubeerd werd. Door toevoeging van $50\text{ }\mu\text{C}$ ^{59}Fe (II) werd de saturatie van het transferrine op 76% gebracht. Na een incubatieperiode van 18 uur werd het plasma (5 ml) intraveneus in het konijn teruggebracht. Na 4 uur vond hartpunctie plaats, waarna vervolgens het plasma werd bereid. De saturatiegraad van het aldus bereide plasma bedroeg 42%. Dialyse vond plaats tegen fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4, een albumine oplossing (50 g/l) opgelost in fosfaatbuffer en een mengsel van albumine en gamma globuline (30 g/l resp 20 g/l) eveneens opgelost in fosfaatbuffer. De drie oplossingen waartegen dialyse plaats vond, bevatten ascorbinezuur (eindconc 3 mmol/l) en natriumbicarbonaat (eindconc. 15 mmol/l). Het volume waartegen gedialyseerd werd bedroeg 1,2 ml. De dialysetijd was 5 uur. De resultaten zijn weergegeven in tabel IV.10

Tabel IV.10.

Het percentage niet aan transferrine gebonden Fe in plasma verkregen bij een proefdier, waaraan intraveneus transferrine was toegevoegd dat in vitro met ^{59}Fe werd geïncubeerd. Zie voor bijzonderheden de tekst.

Experiment	Incubatiетijd (in vivo) (uren)	Dialysaat	"vrij" Fe (%)
1	4	fosfaatbuffer	0,3
2	4	albumine	0,7
3	4	albumine/gamma globuline	0,6

Het gevonden Fe, hetwelk niet aan transferrine gebonden is, is niet essentieel verschillend met het percentage "vrij" Fe weergegeven in tabel IV 9.

§ 8 *Enige experimenten betreffende de invloed van zuurstof, koolzuur en ascorbinezuur op de vorming van het Fe - transferrine complex.*

In hoofdstuk I werd uiteengezet dat het vraagstuk van de omzetting van Fe (II) in Fe (III) bij de oplading van transferrine met Fe (II) geenszins is opgelost. Schade wees in 1946 (3) op

de betekenis van zuurstof in dit verband. In zijn proefopzet zou onder anaërobie omstandigheden uit Fe (II) en transferrine in aanwezigheid van bicarbonaat een geel gekleurd complex verschijnen. Wanneer ascorbinezuur werd toegevoegd ging het gevormde complex over in het welbekende zalmkleurige Fe-transferrine, dat ook in aerobe omstandigheden ontstaat. In hoofdstuk I werd ook uiteen gezet dat het vraagstuk van de onmisbaarheid van HCO_3^- voor de vorming van Fe-transferrine niet is opgelost. Wij zijn geneigd op grond van de proeven van Glaser aan te nemen, dat HCO_3^- een katalysator is, niet onmisbaar is en dus niet wordt gebonden aan transferrine tegelijk met Fe. Het leek ons nuttig met het oog op onze in vivo proeven en onze in vivo proefopzet enkele experimenten te verrichten over de besproken vraagpunten. Teneinde het niet aan transferrine gebonden Fe onder anaërobie omstandigheden te bepalen werden de volgende experimenten verricht: Aan 130 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd 1,3 ml ascorbinezuur (300 mmol/l) toegevoegd. Gedurende een nacht werd N_2 doorgeborreld. Vervolgens werd 1,3 ml Fe (II) (conc. 1 mmol/l) toegevoegd en een half uur na toevoegen van Fe (II) tenslotte 1,0 ml transferrine (conc. 1,0 mmol/l). De saturatiegraad van het transferrine zou 65%

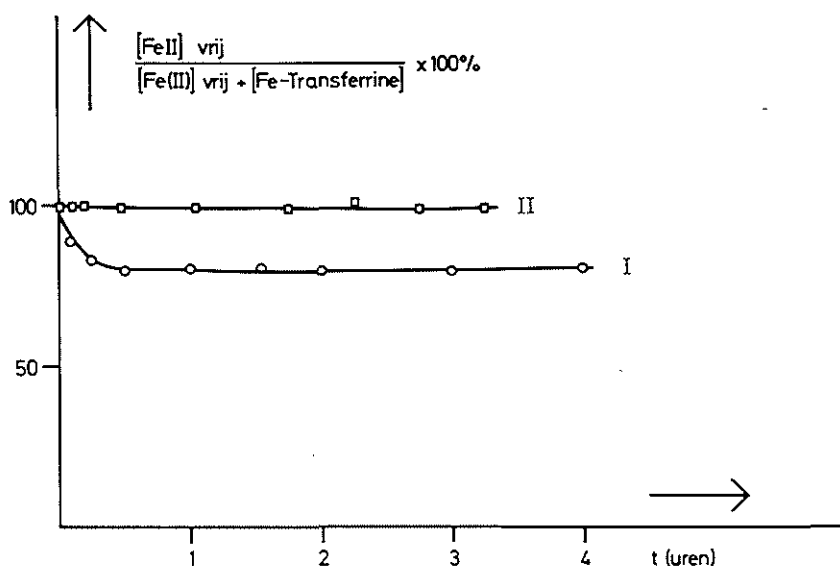


Fig IV.4.

De binding in de tijd van Fe (II) met transferrine in anaëroob milieu in aanwezigheid van ascorbinezuur (I) (3 mmol/l) en natriumdithioniet (II) (3 mmol/l).

bedragen, wanneer al het Fe zich met transferrine zou binden. Het toevoegen van transferrine werd als tijdstip $t = 0$ genomen. Op verschillende tijdstippen werd de niet aan transferrine gebonden Fe (II) concentratie bepaald met de in hoofdstuk II beschreven techniek van de directe Fe (II) bepaling met behulp van een specifiek Fe (II) chromogeen. Eveneens werd na 1 uur het reactiemengsel gedialyseerd gedurende 3 uur tegen 2,0 ml fosfaatbuffer, waarin ascorbinezuur. Fig IV.4 geeft de resultaten weer wat betreft de gemeten hoeveelheden niet aan transferrine gebonden Fe (II) op verschillende tijdstippen.

Bij een dialysetijd van 3 uur bleek de vrije Fe (II) concentratie in de dialysezak gelijk te zijn aan die in de buitenvloeistof. Een overeenkomstige proef werd verricht met een krachtiger reductor dan ascorbinezuur, namelijk natriumdithioniet. Het resultaat is eveneens in fig IV.4 weergegeven. Het is duidelijk dat Fe (II) in aanwezigheid van natriumdithioniet in het geheel niet aan transferrine gekoppeld wordt. Aangaande de rol van bicarbonaat deden we enkele proeven, waarbij door het doorleiden gedurende 18 uur van CO_2 -vrije lucht alle koolzuur verdreven werd. Vrijwel direct na het toevoegen van Fe (II) aan transferrine in aanwezigheid van ascorbinezuur en fosfaatbuffer ontstond ook in dit koolzuur vrije milieu de welbekende zalmkleur van Fe-transferrine. De kleurintensiteit nam in de loop van de tijd toe, de meting van de extinctie bij 470 nm leerde dat pas na 6 uur een maximale extinctie bereikt was. Met toevoeging bij de aanvang van de proef van bicarbonaat aan het reactiemengsel, waarvan de samenstelling overeenkwam met de steeds door ons gebruikte proefopstelling, werd bereikt dat de maximale extinctie in 45 min. ontstond. Onze conclusie is dat HCO_3^- een katalysatorrol speelt en niet onmisbaar is. De opvattingen van Schade vooral over de mogelijkheid zuurstof te vervangen door ascorbinezuur gaven ons aanleiding tot het volgende experiment. Door 50,0 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4) werd gedurende 18 uur N_2 geleid. Daarna werd 0,85 ml transferrine (conc. 0,80 mmol/l) toegevoegd, dit tijdstip werd als tijdstip 0 beschouwd. Na 10 minuten werd 0,70 ml Fe (II) oplossing (conc. 2,0 mmol/l) toegevoegd. Direct hierop volgend werd de concentratie van het vrije Fe (II) bepaald met de techniek in hoofdstuk II beschreven. Weer 10 minuten later werd 0,85 ml natriumbicarbonaat (conc. 1,0 mol/l) toegevoegd en wederom werd de Fe (II) concentratie bepaald. Vervolgens werd 10 minuten later 1,50 ml ascorbinezuur (conc. 0,1 mol/l) toegevoegd en direct daarop de concentratie van het vrije Fe (II) bepaald. Na verloop van wederom 10 minuten werd het reactievat geopend en dus zuurstof toegelaten. Na verloop van 15 mi-

nuten werd zowel de concentratie van het vrije Fe (II) als de extinctie bij 470 nm gemeten. De resultaten zijn samengevat in Tabel IV.11.

Tabel IV.11.

De invloed van zuurstof, koolzuur en ascorbinezuur op de oplading van transferrine met Fe.
Zie voor verdere bijzonderheden de tekst.

Tijdstip (min)	Toevoeging	Kleur Ext. 470 nm	[Fe (II)] ($\mu\text{mol/l}$)
0	Transferrine	geen	0
10	Fe (II)	geen	26,5
20	HCO_3^-	geen	26,2
30	Ascorbinezuur	geen	23,1
40	Zuurstof	ontwikkeling zalmkleur	
55		0,063	0,3

Onze conclusie is dat in de beschreven proefopstelling zuurstof onmisbaar is voor het tot stand komen van het Fe-transferrine complex, dat in tegenstelling tot Schade's opvatting het ascorbinezuur de rol van zuurstof niet kan overnemen. Toevoeging van bicarbonaat leidde niet tot een binding van Fe aan transferrine onder vorming van een bruin gekleurd complex.

HOOFDSTUK V.

IN VIVO DIALYSE EXPERIMENTEN BIJ KONIJNEN

Inleiding.

Nadat we bij in vitro experimenten een indruk hadden verkregen omtrent de binding van Fe aan transferrine, was de volgende stap een aantal experimenten in vivo te verrichten. Het vraagstuk van niet aan transferrine gebonden Fe in vivo is nog volledig onbeantwoord. De experimentele moeilijkheden die bij deze probleemstelling naar voren komen zijn groot. Op grond van onze ervaring met in vitro proeven kozen wij een dialyse opzet. Als proefdier werd een konijn genomen vanwege de gemakkelijk te bereiken bloedvaten in het oor. Het konijn werd gedurende een bepaalde tijd onder verdoving gebracht. Gedurende die tijd werd het bloed gedialyseerd tegen een fosfaatbuffer, waarin al of niet albumine en globuline aanwezig was. De samenstelling van de dialysevloeistof werd gevarieerd ten einde na te kunnen gaan in hoeverre eventueel niet aan transferrine gebonden Fe uitwisselt indien geen of een lage eiwitconcentratie in het dialysaat aanwezig is. Dit in verband met het vraagstuk van de uitwisseling van "vrij" Fe in plasma met de interstitiele vloeistof. Wij streefden ernaar het volume waartegen het bloed werd gedialyseerd zo klein mogelijk te houden. Het volume van het dialysaat bedroeg ongeveer 1,5 - 2,0% van het bloed van het konijn. Het grote voordeel hiervan is, dat de bestaande situatie wat betreft de ionenbalansen die componenten, die een belangrijke rol kunnen spelen bij het ijzer-transferrine systeem nauwelijks een concentratie verandering ondergaan.

Het grote nadeel van een dialyseopzet blijkt te zijn, dat de experimenten voor het bereiken van volledig evenwicht te lang zouden moeten duren. Wanneer ^{59}Fe wordt gebruikt, dialyseert men door de opname van Fe in diverse organen tegen een voortdurend afnemende ^{59}Fe concentratie in het bloed. Op grond van de afnemende ^{59}Fe concentratie in de tijd diende de dialysetijd zodanig gekozen, dat geen volledig evenwicht kon worden bereikt.

Een ultrafiltratie opzet waarbij het genoemde nadeel wegviel konden wij niet ontwikkelen in verband met de binding van Fe aan albumine.

§ 1 Ontwikkelen van de proefopzet.

DIALYSE SYSTEEM.

Voor de dialyse opzet werd het dialyse systeem van de Auto-analyser (Technicon) toegepast. Het bloed werd aan de ene kant van de membraan rondgepompt. Aan de andere kant werd de vloeistof rondgepompt waartegen gedialyseerd werd. Er werd gebruik gemaakt van LKB 10200 perspex pompen. De pompsnelheid voor de te dialyseren vloeistof gedroeg 180 ml/uur. Voor de bloedstroom werd een pompsnelheid van 100 ml/uur toegepast. Het slangen systeem bestond uit hoog polymeer polysiloxaan materiaal (LKB) met een inwendige diameter van 1,30 mm. De slangen werden aangesloten op daarvoor geschikte naalden (Braunüle Gr 1 R, B Braun Melsungen) en aan elkaar bevestigd door middel van cyclohexanon. Bij de dialyse werden Cuprophane membranen 105 - 1058 van Technicon gebruikt. De dialysator werd geplaatst in een waterbad van 37°C. Voor elk experiment werd een nieuwe dialysmembraan genomen.

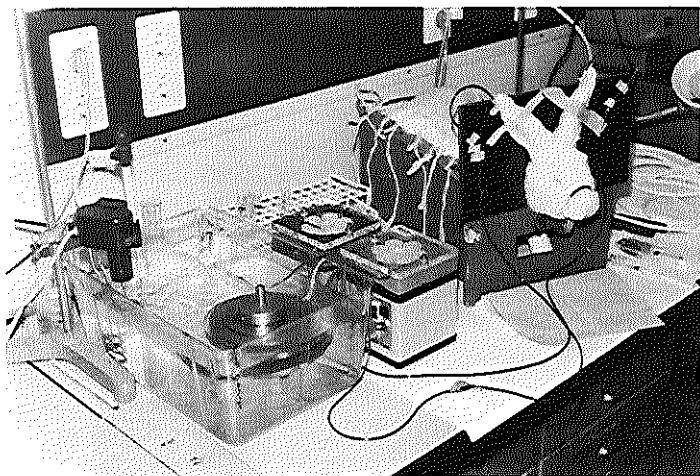


Foto V.I.

De bij de in vivo experimenten toegepaste dialyse-opzet.

Foto V.I maakt een en ander duidelijk. Allereerst werd nagegaan hoe snel Fe de membraan passeert. Dit werd onderzocht

door de volgende oplossing via het slangensysteem van de bloedbaan rond te pompen. De oplossing was als volgt samengesteld: Aan 200 ml fosfaatbuffer 0,05 molair pH 7,4 werd 2,0 ml ascorbinezuur (conc. 0,3 mol/l) toegevoegd. Vervolgens werd 1 ml Fe (II) (conc. 1,0 mmol/l) gemerkt met 1 μC ^{59}Fe (II) mengsel toegevoegd. Het ^{59}Fe , hetwelk als FeCl_3 aanwezig was, was met ascorbinezuur reeds gereduceerd. De eindconcentratie van het Fe bedroeg 5,0 $\mu\text{mol/l}$. Aan het mengsel werd natriumbicarbonaat toegevoegd, zodanig dat de eindconcentratie 20 mmol/l was. Aan de andere zijde van de membraan werd 3,40 ml fosfaatbuffer 0,05 mol/l pH 7,4, waarin zich de bovengenoemde componenten bevonden met uitzondering van het Fe, rondgepompt. Op verschillende tijdstippen werd nagegaan welk percentage van het ijzer vanuit de vloeistof in het "bloedcompartiment" naar het dialysaat was gediffundeerd. De Fe bepaling werd verricht met de micromethode, beschreven in hoofdstuk II. Tevens werd de ^{59}Fe concentratie bepaald. Onderstaande tabel geeft de verhouding van de Fe concentraties weer in het dialysaat en de te dialyseren vloeistof op verschillende tijdstippen.

Tabel V.1.

De verhouding van de Fe concentratie in dialysaat en de te dialyseren vloeistof na verschillende dialysetijden.

Tijd (uren)	Te dialyseren vloeistof Fe concentratie		[Fe] ($\mu\text{mol/l}$) (dialysaat)		[Fe] dialysaat [Fe] te dialyseren vloeistof	
	$\mu\text{mol/l}$	^{59}Fe cpm	$\mu\text{mol/l}$	^{59}Fe cpm	chemisch	m.b.v. ^{59}Fe
$\frac{1}{2}$	5,0	4620	2,1	1780	0,42	0,38
1	5,0	4600	3,3	3100	0,66	0,67
$1\frac{1}{2}$	5,0	4580	3,6	3418	0,72	0,75
$2\frac{1}{2}$	5,0	4470	4,3	3743	0,86	0,84

Bovenstaande experimenten zijn verricht met een oplossing waarvan de Fe concentratie 5,0 $\mu\text{mol/l}$ bedroeg. Bedraagt de Fe concentratie 2,0 $\mu\text{mol/l}$, dan wordt na $1\frac{1}{2}$ uur een Fe concentratie van 1,6 $\mu\text{mol/l}$ in het dialysaat gevonden, hetgeen goed overeenstemt met bovenstaande waarnemingen.

Uit de in vitro experimenten, besproken in hoofdstuk III, was gebleken, dat de invloed van albumine niet zonder meer verwaarloosd kan worden. Zoals reeds eerder vermeld, kan de invloed van de binding van Fe aan albumine opgeheven worden door tegen eenzelfde albumine concentratie te dialyseren. De uitwisselingssnelheid via de membraan van het aan albumine gebonden Fe met albumine mag echter geen belemmering opleveren.

In hoeverre dit het geval is, werd door ons als volgt onderzocht: Aan 50 ml albumine oplossing (50 g/l) werd 0,5 ml ascorbinezuur (conc. 0,3 mol/l), 1 ml natriumbicarbonaat (conc. 1 mol/l) en 0,10 ml Fe (II) (conc. 1,0 mmol/l) gemerkt met $0,1 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$ toegevoegd. Gedialyseerd werd tegen een albumine oplossing, die alle bovenstaande componenten bevatte met uitzondering van ^{59}Fe . Na $1\frac{1}{2}$ uur bleek het percentage ^{59}Fe in het dialysaat ten opzichte van Fe in de oplossing, die gedialyseerd werd, 89% te zijn. Vergelijken we deze getallen met die in tabel V.1, dan komt men tot de conclusie, dat de binding van Fe aan albumine niet van een dusdanige sterkte is, dat de uitwisseling via de membraan werd belemmerd in onze proefopzet.

Bij de in vivo dialyse experimenten komt verder de vraag naar voren in hoeverre het niet aan transferrine gebonden Fe aan andere in plasma voorkomende eiwitten dan aan albumine gebonden kan worden. Dialyse tegen een albumine oplossing zou te lage waarden kunnen geven wanneer er sprake zou zijn van bijvoorbeeld een binding tussen Fe en gamma-globuline en laatstgenoemde binding zou veel sterker zijn dan die tussen Fe en albumine. Om bovenstaand probleem te onderzoeken werd aan konijnenplasma meer Fe toegevoegd dan maximaal aan transferrine gebonden kon worden. Daarna werd het mengsel gedialyseerd tegen een albumine oplossing in fosfaatbuffer. De experimenten werden als volgt verricht: Aan 40,0 ml konijnenplasma werd Fe (II) (conc. 2,0 mmol/l) en $0,5 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$ toegevoegd. Er werd meer Fe aan het plasma toegevoegd dan maximaal aan het transferrine gebonden kon worden. De hoeveelheden toegevoegd Fe, die maximaal aan transferrine gebonden konden worden en de toegevoegde hoeveelheden Fe staan weergegeven in tabel V.2. Na de Fe toevoeging werd het mengsel 2 uur geïncubeerd en vervolgens gedialyseerd tegen 3,40 ml van een albumine oplossing in fosfaatbuffer. Bij de dialyse werd gebruik gemaakt van de dialyse-opzet zoals reeds eerder beschreven in deze paragraaf. Door na dialyse de ^{59}Fe concentratie te meten in het dialysaat kan nagegaan worden in hoeverre het Fe aan andere eiwitten gebonden is dan aan albumine. Tabel V.2 geeft een overzicht van de resultaten. Hierbij is er van uitgegaan dat het transferrine voor 100% verzadigd is. De overmaat ijzer is opgevat als niet aan transferrine gebonden ijzer.

Vergelijken we de uitkomsten van tabel V.2 met de gegevens weergegeven in tabel V.1, dan komen we tot de conclusie, dat de aanwezigheid van een ander eiwit dan albumine bij dialyse experimenten nauwelijks stoort, mits de dialyse plaatsvindt tegen een albumine oplossing. In overeenstemming met deze conclusie is het feit dat bij cellulose-acetaatelectrophorese van plas-

Tabel V.2.

De verhouding van de Fe concentratie van het niet aan transferrine gebonden Fe in de te dialyseren vloeistof t.o.v. de Fe concentratie in het dialysaat bij oververzadiging van plasma met Fe.

dialyseduur (uren)	Fe($\mu\text{mol/l}$)			TYBC ($\mu\text{mol/l}$)	$\frac{\text{Fe}_{\text{dialysaat}}}{\text{Fe}_{\text{tot}} - \text{TYBC}}$
	plasma	toegevoegd	totaal		
2	14,9	69,3	84,2	67,0	0,74
1½	31,9	50,1	82,0	71,0	0,78

ma waaraan een overmaat Fe was toegevoegd, het Fe slechts in de β -globuline fractie (transferrine) en aan het albumine gebonden bleek te zijn.*

§ 2 Resultaten verkregen met behulp van in vivo dialyse experimenten bij konijnen.

Met de in paragraaf 1 van dit hoofdstuk besproken opstelling werd vervolgens een aantal proeven met konijnen verricht. Een van deze experimenten en wel experiment II wordt in het navolgende uitvoerig besproken.

Aan het konijn nummer II werd intraveneus 25 μC ^{59}Fe (II) opgelost in 4,0 ml fysiologisch zout toegediend. Twee uur nadat het ^{59}Fe was toegediend werd het konijn gefixeerd (zie fig. V.1). Na fixatie werd een dosis Hypnorm intramusculair gegeven (0,5 ml/kg lichaamsgewicht). Na verloop van 5 minuten werd intraveneus 2,0 ml heparine oplossing (5000 I. U./ml) toegediend. Voor verdere technische details wat betreft Hypnorm, heparine en ^{59}Fe zij verwezen naar hoofdstuk II. De injectieplaatsen werden gedicht met collodium. Het dialyse systeem werd intussen gevuld. Aan de ene kant van de membraan werd 3,4 ml albumine in fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4 gebracht. De oplossing bevatte ascorbinezuur (eindconc. 3,0 mmol/l) en natriumbicarbonaat (eindconc. 20 mmol/l). De eiwitconcentratie bedroeg 50 g/l. Aan de andere kant van de membraan werd het slangensysteem gevuld met een citraat-glucose oplossing met een concentratie van 2,3% (w/v) voor beide stoffen. Vervolgens werd een naald, die verbonden was met het slangensysteem, in een oorslagader gebracht. Onmiddellijk daarna werd de pomp in werking

*Waarnemingen in ons Laboratorium gedaan door C.v.d.Heul.

gesteld. De dialyse werd pas gestart na verdringing van lucht, glucose en citraat in het slangensysteem door het bloed. Alvo-rens het systeem gesloten werd, werd ongeveer 10 ml bloed apart opgevangen, teneinde de diverse grootheden zoals het se-rum-ijzergehalte, het haemoglobinegehalte, de haematocriet, de ^{59}Fe radioactiviteit en de ijzerbindingscapaciteit te kunnen be-palen. Het systeem werd gesloten door een tweede naald in de oorader van het andere oor van het konijn te brengen. Direct daarop werd de tweede pomp aangezet. Het eventueel afnemen van kleine hoeveelheden bloed tijdens het experiment geschiedde met een zeer dunne naald, die in de slang geprikt werd, die naar de oorader liep. De berekening van het dialyseerbaar Fe vond als volgt plaats: Bij een dialysetijd van 2 uur werd de ^{59}Fe radioactiviteit in 1,0 ml bloed bij het begin (62.200 c.p.m.) en aan het einde (32.100 c.p.m.) van de dialyse gemeten. De hoe-veelheid dialyseerbaar Fe kan in % van de totale hoeveelheid Fe in plasma worden uitgedrukt, door de verhouding te berekenen van de ^{59}Fe radioactiviteit in 3,4 ml van het dialysaat (320 c.p.m.) ten opzichte van de gemiddelde ^{59}Fe radioactiviteit in het bloed over de tijdsduur van de dialyse, dit was $\frac{1}{2}(62.000 + 32.100) = 47.150/\text{ml}$. De hoeveelheid dialyseerbaar Fe bedroeg dus 0,2%.

Tabel V.3.

Bijzonderheden betreffende de gebruikte konijnen bij de in vivo dialyse experimenten.

Experiment	Gewicht (g)	Hb (mmol/l)	Ht (%)	SeFe ($\mu\text{mol/l}$)	TYBC ($\mu\text{mol/l}$)
I	3200	6,0	34	15	-
II	3000	7,0	36	28	-
III	3100	8,5	38	26	-
IV	3100	8,1	37	14	49
V	3900	8,3	37	29	97
VI	2800	8,0	35	39	115
VII	3000	7,8	35	32	100
VIII	3000	8,1	36	36	73
IX	3300	7,3	38	36	85
X	3200	7,5	38	34	63
XI	2900	6,0	36	35	65
XII	3300	6,3	38	38	60
XIII	3400	6,5	36	27	86
XIV	3000	6,3	33	32	103

Op de beschreven wijze werden in totaal 14 dialyseexperimenten uitgevoerd. Zoals reeds werd opgemerkt zijn daarbij variaties in de samenstelling van de dialysevloeistof aangebracht. Gedialyseerd werd tegen fosfaatbuffer 0,05 mol/l (pH 7,4), fosfaatbuffer met albumine (50 g/l) of fosfaatbuffer met albumine (30 g/l) en gamma globuline (20 g/l), of fosfaatbuffer met albumine (0,25 g/l). Bijzonderheden omtrent de gebruikte proefdieren zijn samengevat in tabel V.3.

De resultaten van de proeven zijn samengevat in tabel V.4.

Tabel V.4.

Het percentage dialyseerbaar ijzer gevonden bij konijnen met in vivo dialyse experimenten.

Experiment	Aard dialysaat	Dialyseuur (uren)	Dialyseerbaar ^{59}Fe (%)
I	albumine (50 g/l)	1	0,4
II	albumine (50 g/l)	2	0,2
III	albumine (50 g/l)	1	0,3
IV	albumine (30 g/l) / γ globuline (20 g/l)	1	0,1
V	albumine (30 g/l) / γ globuline (20 g/l)	1	0,4
VI	albumine (30 g/l) / γ globuline (20 g/l)	1	0,5
VII	albumine (30 g/l) / γ globuline (20 g/l)	$1\frac{1}{2}$	0,3
VIII	albumine (30 g/l) / γ globuline (20 g/l)	1	0,3
IX	albumine (30 g/l) / γ globuline (20 g/l)	$1\frac{1}{2}$	0,4
X	albumine (30 g/l) / γ globuline (20 g/l)	$1\frac{1}{2}$	0,3
XI	fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4	$1\frac{1}{2}$	0,1
XII	fosfaatbuffer (0,05 mol/l) pH 7,4	$1\frac{1}{2}$	< 0,1
XIII	albumine (0,25 g/l)	$1\frac{1}{2}$	< 0,1
XIV	albumine (0,25 g/l)	$1\frac{1}{2}$	< 0,1

Bijzonderheden betreffende de experimenten.

- Exp. I Ingebracht 50 μC ^{59}Fe (II) opgelost in 4 ml fysiologische zout oplossing. De dialyse begon 1 uur na het tijdstip van toediening van het ^{59}Fe .
- Exp. II Ingebracht 25 μC ^{59}Fe (II) opgelost in 4 ml fysiologische zout oplossing. De dialyse begon 2 uur na het tijdstip van toediening van het ^{59}Fe .
- Exp. III Ingebracht 25 μC ^{59}Fe (II) opgelost in 3,7 ml fysiologische zout oplossing. De dialyse begon 1 uur na

- het tijdstip van toediening van het ^{59}Fe .
- Exp. IV Ingebracht $25\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe (II)}$ opgelost in 4 ml fysiologische zout oplossing. De dialyse begon 1 uur na het tijdstip van toediening van het ^{59}Fe .
- Exp. V Ingebracht $25\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe (II)}$ opgelost in 3,5 ml fysiologische zout oplossing. De dialyse begon 2 uur na het tijdstip van toediening van het ^{59}Fe .
- Exp. VI Ingebracht $50\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe (II)}$ opgelost in 3,9 ml fysiologische zoutoplossing. De dialyse begon 4 uur na het tijdstip van toediening van het ^{59}Fe .
- Exp. VII Ingebracht $25\ \mu\text{C Fe (II)}$ gebonden aan konijnen transferrine. De "saturatiegraad" van het transferrine bedroeg 30%. De oplading van het transferrine vond als volgt plaats: Aan $25\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe (II)}$ werd 0,2 ml ascorbinezuur (conc. 3,0 mmol/l) toegevoegd. Na een half uur staan, werd bovenstaand mengsel toegevoegd aan fosfaatbuffer pH 7,4 (conc. 0,05 mol/l) waarin zich natriumbicarbonaat (eindconc. 25 mmol/l) en transferrine bevond. In $25\ \mu\text{C } ^{59}\text{FeCl}_3$ bevond zich $0,053\ \mu\text{mol } ^{56}\text{Fe}$, zodat de toegevoegde hoeveelheid transferrine, teneinde een "saturatiegraad" van 30% te verkrijgen, $0,089\ \mu\text{mol}$ bedroeg. De pH van het mengsel bedroeg 7,2. Het mengsel werd gedurende 24 uur bewaard bij 20°C en werd vervolgens in het konijn gebracht. Direct daarop volgend werd de dialyse aangevangen.
- Exp. VIII Aan $0,033\ \mu\text{mol}$ konijmentransferrine werd $25\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe (II)}$ toegevoegd op een zodanige wijze, dat de "saturatiegraad" 80% bedroeg. De proefomstandigheden waren verder identiek met die in exp. VII.
- Exp. IX Aan konijmentransferrine werd $^{59}\text{Fe (II)}$ toegevoegd. De Fe (II) en de transferrine concentraties waren identiek met die in exp. VII. Het reactiemengsel werd geschud gedurende een half uur met 100 mg MgCO_3 , zodat het niet aan transferrine gebonden Fe werd verwijderd. De verzadigingsgraad van het transferrine-ijzer complex bedroeg 30%. Na uitschud - den met MgCO_3 werd het transferrine - ijzer complex in de bloedbaan van het konijn terug gebracht. De dialyse begon 1 uur na het tijdstip van toediening van het transferrine - ijzer complex.
- Exp. X Experiment X is op identieke wijze uitgevoerd als experiment IX. De verzadigingsgraad van het transferrine - ijzer complex bedroeg echter 80%.
- Bij de experimenten XI, XII, XIII en XIV werd $50\ \mu\text{C } ^{59}\text{Fe (II)}$ ingebracht. De dialyse werd aangevangen 3 uur nadat het ^{59}Fe was ingebracht.

HOOFDSTUK VI.

DISCUSSIE.

De probleemstelling van het onderzoek was zoals in hoofdstuk I vermeld werd de al of niet aanwezigheid in plasma van niet aan transferrine gebonden ijzer, dit in verband met de vraag of "vrij ijzer" een rol speelt bij het transport van dit metaal in het organisme zoals Laurell veronderstelde. Uit de waarden van de evenwichtsconstanten van het ijzer - transferrine complex, zoals die in hoofdstuk I zijn besproken, kan geen antwoord op de gestelde vraag worden afgeleid. Dit wordt veroorzaakt door het feit, dat de gegevens a) tegenstrijdig zijn en b) vanwege de totaal verschillende proefomstandigheden, die gebruikt werden. Teneinde inzicht in het gestelde probleem te verkrijgen verrichtten wij dialyse en ultrafiltratie experimenten in vitro en dialyse experimenten in vivo. Voor onze in vitro experimenten kozen we proefomstandigheden, die in de eerste instantie aansloten bij die van Glaser. De bedoeling van Glaser's keuze was fysiologische omstandigheden zo dicht mogelijk te benaderen. De resultaten van het werk van Glaser gaven ons aanleiding nog eens zorgvuldig de karakteristika van de gebruikte proefomstandigheden na te gaan, in het bijzonder het evenwicht tussen Fe (II) en Fe (III) in aanwezigheid van fosfaatbuffer 0,05 molair (pH 7,4) en ascorbinezuur en dit zowel in anaeroob als in aeroob milieu. De resultaten van dit onderzoek worden beschreven in hoofdstuk III. Aanvankelijk gingen we er vanuit, dat ascorbinezuur bij pH 7,4 in staat zou zijn een Fe(II) oplossing in gereduceerde toestand te houden. Uit onze proeven bleek duidelijk, dat er onderscheid gemaakt moet worden tussen aerobe en anaerobe omstandigheden. Onder anaerobe omstandigheden bleek genoemde veronderstelling juist te zijn. Onder aerobe omstandigheden hield ascorbinezuur het ijzer slechts voor een gedeelte in de Fe (II) vorm. In aanwezigheid van zuurstof is een complicerende factor de ontleding van ascorbinezuur via dehydroascorbinezuur en diketogulonzuur in oxaalzuur en threoninezuur. Wij slaagden er in te bewijzen, dat onder anaerobe omstandigheden het Fe (II) - Fe (III) evenwicht in de door ons gekozen proefomstandigheden goed benaderd en beschreven kan worden met de vergelijking van Cooper:

$$E^h = 1011 - 58 \log \text{Fe(II)} - 174 \text{ pH}$$

Dit houdt in dat Fe (III) - ionen onder onze proefomstandigheden slechts voorkomen in hoeveelheden van 10^{-18} mol/l.

Wij menen de vraag betreffende het bestaan van een ijzer - ascorbinezuur complex te hebben kunnen ophelderen. Ons inziens bestaat er een Fe (III) - ascorbinezuur complex en geen Fe (II) - ascorbinezuur complex.

Resumerende menen wij dus te kunnen stellen dat het in anaeroob milieu mogelijk is onder onze proefomstandigheden door uit te gaan van Fe (II) en toevoeging van ascorbinezuur voor vrijwel 100% met Fe (II) ionen te werken. Het fosfaat stoort niet evenmin zijn er Fe (II) - ascorbinezuur moleculen te verwachten.

In aeroob milieu is de situatie in het bestudeerde systeem veel ingewikkelder. Dit wordt veroorzaakt door de genoemde ontleding van ascorbinezuur, terwijl Fe (II) wordt omgezet in Fe (III) en er aanwijzingen zijn voor een Fe (III) - ascorbinezuur complex. We mogen aannemen, dat ook in aeroob milieu de Fe (III) ionen concentratie bepaald zal worden door het oplosbaarheidsprodukt van $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Evenwel blijkt het moeilijk in aeroob milieu te werken met Fe (II), ondanks de toevoeging van ascorbinezuur. Dat wij desondanks toch ascorbinezuur kozen als reductans ligt voor de hand, want zonder ascorbinezuur is er vrijwel geen Fe (II) aanwezig, terwijl de Fe (III) - ionen concentratie verwaarloosbaar klein is. Wij zijn niet in staat om precies aan te geven wat de invloed van het Fe(III) - ascorbinezuur complex in onze proefopzet is, door het volledig ontbreken van gegevens betreffende de fysisch-chemische eigenschappen van dit complex.

Gezien de resultaten in hoofdstuk III werd voor de dialyse opzet in hoofdstuk IV een techniek uitgewerkt met een zo kort mogelijke dialyseduur, teneinde de ontleding van ascorbinezuur tot een minimum te kunnen beperken. De dialyseduur kon echter niet korter worden dan vijf uur. Mede daarom werd getracht een ultrafiltratieopzet te ontwikkelen waardoor de tijdsduur van een experiment tot ongeveer 20 minuten kon worden terug gebracht.

Alvorens de binding tussen transferrine en ijzer in aeroob milieu werd bestudeerd, werd nagegaan in hoeverre een Fe(II) of een Fe(III) zout geschikt was voor de oplading van transferrine in aeroob milieu. De hierbij toegepaste methodiek berust op het tot stand komen van een zalmkleur (absorptiemaximum 470 nm) wanneer ijzer met transferrine reageert. Uitgaande van een oplossing, die transferrine bevatte, werd zowel door toevoeging van een Fe(II) zout of een Fe(III) zout de kleurontwikkeling op verschillende tijden bij 470 nm gemeten. Het bleek, dat het ge-

bruik van een Fe(II) zout veel sneller tot de maximale kleurontwikkeling leidde. Met zowel ultrafiltratie als dialyse werd met bovengenoemde wijze van oplading met een Fe(II) zout nagegaan hoeveel niet aan transferrine gebonden ijzer aanwezig was onder diverse omstandigheden. In de daartoe uitgevoerde experimenten werd het transferrine opgeladen met een Fe(II) zout tot verzadigingsgraden die varieerden van 30 - 80%. In het reactiemengsel was ascorbinezuur aanwezig. Uit de genoemde ultrafiltratie- en dialyseexperimenten bleek, dat de binding tussen ijzer en transferrine, in het door ons beschreven systeem, van een dusdanige aard was, dat er sprake was van niet aan transferrine gebonden ijzer. Tussen ultrafiltratie- en dialyseexperimenten bleek goede overeenkomst te zijn. Bij een oplopende verzadigingsgraad van het transferrine werd een grotere concentratie niet aan transferrine gebonden ijzer gevonden. Bij een verzadigingsgraad van het transferrine van 30 resp. 80% werd een percentage van 0,3 resp 1,8 gevonden. Bij toevoeging van bathophenanthroline-disulfonzuur aan het dialysaat of ultrafiltraat bleek de oplossing zeer zwak rose te kleuren, hetgeen erop wees, dat dit ijzer grotendeels als Fe(II) aanwezig was. Helaas waren we gezien de geringe concentratie ijzer niet in staat om kwantitatief de hoeveelheid Fe(II) en Fe(III) nauwkeurig vast te leggen.

Naast de probleemstelling in hoeverre er dialyseerbaar of ultrafiltreerbaar ijzer in het transferrine - ijzer systeem aanwezig was, was het voor ons van belang om met het in hoofdstuk III gekarakteriseerde systeem enige experimenten te verrichten omtrent de rol van zuurstof, ascorbinezuur en natriumbicarbonaat. Dit naar aanleiding van gegevens van Schade. Bij experimenten waarbij bicarbonaat uitgesloten werd maar zuurstof toegelaten werd, vond oplading van transferrine met ijzer plaats. De oplading verliep echter aanmerkelijk langzamer dan in aanwezigheid van bicarbonaat. Wij sluiten ons dus aan bij de opvatting dat bicarbonaat een katalysator is een geen component van de ijzer - transferrine binding. Bij uitsluiting van zuurstof bleek vrijwel geen oplading van transferrine met ijzer, dat in de Fe(II) vorm was, plaats te vinden. Wij maakten bij deze proeven gebruik van de door ons ontwikkelde bepalingstechniek van Fe(II) bij pH 7,4. Onze resultaten op dit punt bleken overeen te komen met een na afsluiting van onze proefnemingen gepubliceerd onderzoek van Gaber en Aisen (50). Zij kwamen door middel van U.V. metingen tot de conclusie dat het Fe(II) in het geheel niet of slechts zeer zwak aan het transferrine molecuul gebonden wordt.

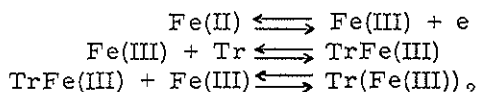
Ascorbinezuur bleek bij de door ons gedane experimenten in

anaeroob milieu geen rol te spelen bij de oplading van transferrine met ijzer. Hiermede konden we de theorie van Schade, volgens welke ascorbinezuur bij de oplading van transferrine met Fe(II) onder anaerobe omstandigheden een essentiële rol speelt, niet bevestigen.

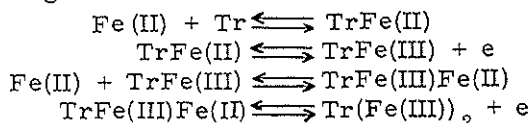
De resultaten verkregen onder aerobe en anaerobe omstandigheden kunnen we testen aan de volgende door Glaser opgenoemde mogelijkheden met betrekking tot de vorming van het ijzer - transferrine complex.

- a) Fe(II) moet eerst tot Fe(III) geoxideerd worden. Daarna vindt de binding met transferrine plaats.
- b) Fe(II) bindt zich met transferrine en vervolgens vindt op het eiwitmolecuul de oxidatie plaats.

Wanneer a zou gelden, dan komen we tot het volgende reactiemechanisme:



In geval b zou gelden:



Op grond van onze resultaten is het niet mogelijk tussen de mechanismen a en b te kiezen. Wel kan worden vastgesteld dat de binding tussen Fe(II) en transferrine, indien deze een rol speelt, buitengewoon zwak moet zijn. Evenmin als Gaber en Aisen op grond van hun gegevens, durven wij op grond van onze echter het bestaan van een Fe(II) - transferrine complex uit te sluiten. Voor mechanisme b pleit het feit, dat zoals beschreven, de oplading van transferrine met Fe(II) veel beter verloopt dan met Fe(III).

Bij in vitro dialyse experimenten bleek de aanwezigheid van albumine in de te dialyseren vloeistof een complicerende factor, doordat Fe zich behalve aan transferrine ook aan albumine blijkt te hechten. Het aan albumine gebonden ijzer valt onder onze formulering "vrij ijzer", want het is niet aan transferrine gebonden. Een en ander bracht principiële moeilijkheden met zich mee, daar naast het ijzer - transferrine systeem nu ook rekening moet worden gehouden met een ijzer - albumine systeem. Aangezien het ons in eerste instantie ging om niet aan transferrine gebonden ijzer, losten wij deze moeilijk-

heid op door een dialyse van een vloeistof waarin albumine aanwezig was te verrichten tegen een oplossing, die eenzelfde hoeveelheid albumine bevatte. Dit werd dus bij de in vitro proeven met plasma gedaan. Bij deze in vitro proeven, verricht met humaan- en konijnen plasma, bleek een percentage dialyseerbaar ijzer aanwezig te zijn. Het percentage niet aan transferrine gebonden ijzer, gevonden bij dialyse experimenten van humaan- en konijnen plasma, lag in dezelfde grootte orde als het percentage niet aan transferrine gebonden ijzer gevonden bij het in vitro transferrine - ijzer systeem. Het gevonden percentage bedroeg 0,4 bij een saturatie van 45% en 0,8 bij een saturatie van 89%. Uit het geringe percentage niet aan transferrine gebonden ijzer in aanwezigheid van albumine moet geconcludeerd worden, dat, zoals te verwachten was, de binding van transferrine met ijzer veel sterker is dan die van albumine met ijzer. Het moet echter in hoge mate onwaarschijnlijk geacht worden, gezien de binding tussen ijzer en albumine, dat indien er naast transferrine albumine aanwezig is, er nog sprake zal zijn van een meetbare concentratie niet aan een van deze eiwitten gebonden hoeveelheid ijzer.

Nadat bij in vitro experimenten een indruk was verkregen omtrent de aanwezigheid van niet aan transferrine gebonden ijzer, werd een proefopzet ontwikkeld, die geschikt was voor in vivo experimenten. Door de binding van ijzer aan albumine leek ultrafiltratie minder geschikt.

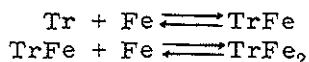
Uitgaande van de ervaring bij de in vitro dialyseexperimenten in hoofdstuk IV werd een systeem ontwikkeld waarbij de aanwezigheid van niet aan transferrine gebonden dialyseerbaar ijzer in vivo aantoonbaar zou zijn. Door toepassing van de door ons ontwikkelde dialyse opzet was het mogelijk om in vivo gedurende een periode van 1 - 2 uur het bloed van een konijn te dialyseren tegen verschillende oplossingen. De dialyse tegen een albumine oplossing met een concentratie overeenkomstig die van plasma gaf resultaten die de aanwezigheid van niet aan transferrine gebonden ijzer bewezen. De gevonden percentages niet aan transferrine gebonden ijzer bedroegen bij een saturatie van ongeveer 40% 0,3 - 0,5% van het totaal aanwezige ijzer. Teneinde de mogelijkheid te onderzoeken of het dialyseerbaar ijzer uitwisselt met de interstitiële vloeistof, werd de dialyse verricht tegen een oplossing met een albumine concentratie die overeenkomt met die van de interstitiële vloeistof. Er werd geen ijzer in het dialysaat aangetoond. Wanneer tegen fosfaatbuffer alleen werd gedialyseerd, was het resultaat hetzelfde.

Wanneer we de resultaten van de in vitro en in vivo experimenten samenvatten, komen we tot de conclusie, dat er niet aan

transferrine gebonden ijzer aanwezig is in plasma. Bij de door ons in vitro gebruikte proefomstandigheden waren het percentages van het totaal aanwezig ijzer, die varieerden van 0,3 - 1,8%, afhankelijk van de verzadigingsgraad van transferrine, en van ongeveer 0,4% bij in vivo proeven, waar de verzadigingsgraad ongeveer 40% was. De geringe uitwisseling van het niet aan transferrine gebonden ijzer met vloeistoffen die geen albumine of een lage concentratie albumine bevatten, sluiten een eventuele rol van het niet aan transferrine gebonden ijzer in het transferrine - ijzer systeem met betrekking tot het ijzertransport wat Laurell stelde, vrijwel uit.

SAMENVATTING.

De algemene opvatting in de literatuur is, dat de reactie tussen het ijzer en transferrine in twee stappen verloopt:



Over het reactiemechanisme bestaat nog veel onzekerheid. Evenmin is het uit de literatuur mogelijk om een definitieve conclusie omtrent de ligging van bovengenoemde evenwichten te trekken. Een kort literatuuroverzicht omtrent de reactie tussen transferrine en ijzer wordt in hoofdstuk I gegeven. Voor een meer uitgebreide literatuurstudie zij verwezen naar het in 1970 verschenen proefschrift van Glaser, "Onderzoekingen omtrent het ijzer-transferrine systeem". Zowel in het proefschrift van Glaser als in de literatuur komt duidelijk de vraag naar voren in hoeverre het niet aan transferrine gebonden ijzer in vivo bij het ijzertransport een rol speelt. Daarbij is een nader inzicht in de invloed van diverse stoffen, zoals ascorbinezuur, zuurstof en bicarbonaat op de reactie tussen ijzer en transferrine van betekenis.

Uitgaande van bovenstaande gegevens werd een onderzoek verricht teneinde de binding tussen ijzer en transferrine zowel in vitro als in vivo nader te karakteriseren. De onderzoekingen werden hoofdzakelijk onder anaerobe omstandigheden verricht. Hierbij werd de mogelijke rol van ascorbinezuur en bicarbonaat nader bestudeerd. Enkele experimenten werden onder anaerobe omstandigheden verricht met het doel de invloed van zuurstof op het ijzer-transferrine systeem na te gaan.

In hoofdstuk II zijn de gebruikte methodieken en materialen beschreven. De ultrafiltratie - opzet en de opstelling, die we gebruikten voor het werken onder anaerobe omstandigheden is in extenso beschreven.

In hoofdstuk III is het onderzoek beschreven waarmee de diverse proefomstandigheden voor de ultrafiltratie- en dialyse experimenten zo zorgvuldig mogelijk konden worden vastgelegd. Het uitgangspunt bij dit onderzoek vormden de proefomstandigheden die Glaser voor zijn dialyse - opzet beschrijft. In verband met onze doelstelling, die afweek van Glaser's doelstelling, bleek het noodzakelijk totaal andere dialyseverhoudingen te kiezen. Wij stelden vast dat de oxidatie van ascorbinezuur in aeroob milieu en de invloed van ijzer hierop een belangrijke rol speelt.

Een opvallend verschil tussen anaerobe en aerobe omstandigheden kwam hierbij naar voren. Onder anaerobe omstandigheden kan het Fe(II) - Fe(III) - ascorbinezuur systeem gekarakteriseerd worden met behulp van de redoxpotentiaal via een vergelijking die Cooper reeds in 1937 op theoretische gronden afleidde voor het Fe(II) - Fe(III) systeem.

In hoofdstuk IV wordt de binding tussen ijzer en transferrine nagegaan met de beschreven dialyse- en ultrafiltratie techniek. Bij verschillende verzadigingsgraden van het transferrine, die opliepen van 30 tot 80% werd bij ultrafiltratie experimenten een toenemend percentage, 0,3 tot 1,8, van het totaal aanwezige ijzer als niet aan transferrine gebonden ijzer gevonden. De resultaten van de dialyse experimenten vertoonden hiermede goede overeenkomst. Met in vitro dialyse experimenten, zowel met humaan- als met konijnen-plasma, werd een percentage van 0,3 - 0,8 van het totaal aanwezige ijzer als niet aan transferrine gebonden aangetoond.

De componenten ascorbinezuur en bicarbonaat bleken in onze proefopzet niet essentieel te zijn voor de binding tussen ijzer en transferrine, dit in tegenstelling tot zuurstof. Het verkrijgen van de bekende zalmkleur, die karakteristiek is voor het transferrine-ijzer complex, bleek slechts tot stand te komen onder invloed van zuurstof.

Bij dialyse en ultrafiltratie bleek de hechting van ijzer aan albumine een complicerende factor. Bij in vivo experimenten en in vitro experimenten met plasma is hiermede zo nodig rekening gehouden door de dialyse experimenten te verrichten tegen een albumine oplossing.

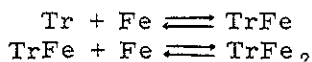
De in vivo experimenten waarbij konijnenbloed werd gedialyseerd worden in hoofdstuk V beschreven. Bij deze in vivo experimenten met ^{59}Fe werd gebruik gemaakt van een door ons ontwikkeld dialyse systeem voor arterieel bloed. De optimale dialysetijd bleek ongeveer 90 minuten te zijn; in dit tijdsverloop wordt de evenwichtstoestand tussen niet aan transferrine gebonden ijzer in bloed en het naar de dialysevloeistof gediffundeerde ijzer niet volledig bereikt. Op grond van in vitro proeven werd een efficiëntie van 70% aangenomen. De in vivo dialyse vond plaats tegen zowel een albumine oplossing, een albumine - gamma globuline oplossing als tegen een fosfaatbuffer. Wanneer de dialyse verricht werd tegen een albumine oplossing of een mengsel van albumine en gamma globulinen, met een eiwitconcentratie van 50 g/l, die overeenkomt met de concentratie in plasma, werd gevonden dat 0,5% van het in plasma aanwezige ijzer dialysabel was. Bij dialyse tegen een albumine oplossing met een concentratie van 0,25 g/l, die overeenkomt

met de concentratie in de interstitiele vloeistof, werd geen ijzer in het dialysaat gevonden. Ditzelfde was het geval als tegen een fosfaatbuffer werd gedialyseerd.

Op basis van de resultaten verkregen met in vivo en in vitro experimenten, kunnen we concluderen, dat het ijzer in plasma vrijwel geheel aan transferrine gebonden is. Ons inziens is het niet aan transferrine gebonden ijzer aan albumine gebonden. De visie van Laurell dat het niet aan transferrine gebonden ijzer wellicht een belangrijke rol speelt bij het ijzertransport kon door de in vivo experimenten niet bevestigd worden.

SUMMARY.

It is now generally accepted that iron reacts with transferrin according to a two step reaction:



However there is still some doubt about the mechanism of the reaction. From the literature it is also not possible to draw definite conclusions concerning the position of the equilibrium in both reaction steps. A survey of the literature concerning the reaction between iron and transferrin is given in chapter I. A more detailed study of the literature is given in the thesis of Glaser (1970): "Onderzoekingen omtrent het ijzer-transferine systeem". In both Glaser's thesis and in the literature the question arises to what extent the free, non-transferrin bound, iron plays a role in the in vivo iron transport. A more detailed study on the influence of ascorbic acid, oxygen and bicarbonate on the reaction between iron and transferrin is necessary.

With these facts in mind a study was made on the binding between iron and transferrin both in vitro and in vivo. The possible role of ascorbic acid and bicarbonate was further investigated. The experiments were carried out mainly under aerobic conditions. Anaerobic conditions were also used in order to study the influence of oxygen on the iron-transferrin system.

In chapter II the methods and materials are described. The ultrafiltration technique and the method we used for the experiments under anaerobic conditions are fully described.

In chapter III the experiments are described in which the ultrafiltration and dialyses conditions were tested and standardized. The experimental conditions as described by Glaser were the starting point in this study. We showed that the oxydation under aerobic conditions of ascorbic acid and the influence of iron on that system play an important role. A remarkable difference between anaerobic and aerobic conditions was noted. Under anaerobic conditions the Fe(II) - Fe(III) system can be characterized with the aid of the redoxpotential via an equation, which was found by Cooper in 1937 theoretically for the Fe(II) - Fe(III) system.

In chapter IV the binding between iron and transferrin is investigated with the dialyse- and ultrafiltration technique as described before. At different degrees of saturation of transferrin

ranging from 30 to 80 percent, 0,3 to 1,8 percent of the total iron was found in vitro as non-transferrin-bound iron. In the ultrafiltration technique the dialyses experiments were in good agreement with these results. In the in vitro dialyses experiments, with human as well as rabbit plasma, 0,3 to 0,8 percent of the total amount of iron present, was found not to be bound to transferrin.

In our experiments ascorbic acid and bicarbonate in contrast to oxygen were not essential for the binding between iron and transferrin. The development of the specific pink colour, which is characteristic for the transferrin-iron complex, was only possible in the presence of oxygen.

In the dialyses- and ultrafiltration experiments the binding of iron to albumin was found to be a complicating factor. Therefore in the in vivo and the in vitro experiments with plasma the dialyses were mostly carried out, when necessary, against an albumin solution.

The in vivo experiments, in which rabbit blood was dialysed are described in chapter V. In these in vivo experiments with ⁵⁹Fe use has been made of the dialyses system for arterial blood as developed by us. The optimal dialyses time was shown to be about 90 minutes; during this time the equilibrium between non-transferrin bound iron in blood and the iron which diffuses to the dialyses fluid was not complete. Based on the in vitro experiments an efficiency of 70 percent was assumed. The in vivo dialyses took place against an albumin solution, an albumin-gamma globulin solution or a phosphate buffer. When the albumin solution or a mixed solution of albumin and gamma globulin, with a protein concentration of 50 g/l was used as dialyses fluid, it was found that 0,5 percent of the iron present in plasma could be dialysed. A protein concentration of 50 g/l was chosen because this is the same concentration as in plasma. After dialyses against an albumin solution with a concentration of 0,25 g/l, resembling the interstitial fluid, no iron was found in the dialysate. The same results were found when phosphate buffer was used.

From the in vivo and in vitro results it is concluded, that the iron in plasma is almost completely bound to transferrin. In our opinion the non-transferrin bound iron is bound to albumin. That non transferrin bound iron possible plays an important role in the transport, as suggested by Laurell, could not be proved by the present in vivo experiments.

Literatuur.

1. Holmberg, C.G., Laurell, C.B. *Acta. Chem. Scand.* 1, 944 (1947).
2. Pollycove, M. *Iron Metabolism*, ed. F. Gross, Springer Verlag 148 (1964).
3. a. Schade, A.L., Caroline, L. *Science.* 100, 14 (1944).
b. Schade, A.L., Caroline, L. *Science.* 104, 340 (1946).
4. Glaser, B.E.A., *Academisch Proefschrift. Med. Fac. Rotterdam.* 1970.
5. Flexner, L.B., Vosburgh, J., Cowie, D. *Amer. J. Physiol.* 153, 503 (1948).
6. Laurell, C.B. *Blood* 6, 183 (1951).
7. Jandl, J.H., Katz, J.H. *J. Clin. Invest.* 42, 314 (1963).
8. Davis, B., Saltman, P., Benson, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8, 56 (1962).
9. Aasa, R., Malmström, B.G., Saltman, P., Vångård, T. *Biochim. Biophys. Acta* 75, 203 (1963).
10. Feitknecht, W., Schindler, P. *J. Pure and Applied Chem.* 6, 168 (1963).
11. a. Bates, G.W., Billups, C., Saltman, P. *J. Biol. Chem.* 242, 2810 (1967).
b. Bates, G.W., Billups, C., Saltman, P. *J. Biol. Chem.* 242, 2816 (1967).
c. Bates, G.W. *J. Biol. Chem.* 242, 4284 (1967).
12. Leusing, D.L., Kolthoff, I.M. *J. Am. Chem. Soc.* 54, 971 (1948).
13. a. Conrad, M.E., Schade, S.G. *Gastroenterology* 55, 35 (1968).
b. Anelli, J. *Acta Cient. Venez.* 9, 105 (1958).
14. Koechlin, B.A. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2649 (1952).
15. Ross, J., Kochwa, S., Wasseman. *Biochim. Biophys. Acta.* 154, 70 (1968).
16. Schade, A.L., Reinhart, R.W., Levie, H. *Arch. Biochem.* 20, 170 (1949).

17. Warner, R.C., Weber, I. J. Am. Chem. Soc. 75, 5094 (1953).
18. Aasa, R., Malmström, B.G., Saltman, P., Vänngård, T. Biochim. Biophys. Acta 75, 203 (1963).
19. Aisen, P., Aasa, R., Malmström, B.G., Vänngård, T. J. Biol. Chem. 242, 2484 (1967).
20. Osaki, S., Johnson, D.A., Frieden, E. J. Biol. Chem. 241, 2746 (1966).
21. Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. Immunochemistry 2, 235 (1965).
22. Surgenor, D.M., Koechlin, B.A., Strong, L.E. J. Clin. Invest. 28 73 (1949).
23. Aisen, P., Leibman, A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 407 (1968).
24. Trinder, P.J. Clin. Path. 9, 170 (1956).
25. Henry, R.J. Clinical Chemistry. Harper and Row, New York. 712 (1966).
26. Roe, J.H., Mills, M.B., Oesterling, M.J. Damron, C.M. J. Biol. Chem. 174, 201 (1948).
27. Ramsay, W.N.M. Clin. Chim. Acta 2, 221 (1957).
28. Herbert, R.W., Hirst, E.G.V., Percival, R.J.W., Reynolds, R.J.W. J. Chem. Soc., 1270 (1933).
29. Borsook, H., Horace, W., Davenport, Jeffreys, C.E.P. Warner, R.C. J. Biol. Chem. 237 (1937).
30. Taqui Khan, M.M., Martell, A.E. J. Am. Chem. Soc. 89, 7104 (1967).
31. Mushran, S.P., Prakash, Satya., J. Ind. Chem. Soc., 24, 389 (1947).
32. Cole, C.V., Jackson, M.L. Journal Phys. and Colloid Chem., 54, 128 (1950).
33. Ball, G.E. Journal Biol. Chem. 118, 219 (1937).
34. Taqui Khan, M.M., Martel, A.E. Journal of Am. Chem. Soc. 90, 3386 (1968).
35. Green, D.E. Biochem. J. 27, 65 (1933).

36. Data for Biochemical Research. At the clarendon press. Oxford 192 (1969).
37. Mahler, H.R., Cordes, E.C. Biological Chemistry. Harper and Row. New York. 207 (1968).
38. Harvey, H.W., Journal Mar. Biol. Assoc. 22, 203 (1937).
39. Cooper, L.H.N. J. Mar. Biol. Ass. 27, 314 (1948).
40. Cooper, L.H.N. Proc. Roy. Soc., B., 124 (229) 1937.
41. Kriukov, P.A., Awsejewitsch, G.P. Z. Elektrochem. 39, 884 (1933).
42. Bray, W.C., Hershey, A.V, J. Amer. Chem. Soc. 56, 1889 (1934).
43. Feitknecht, W., Schindler, P. J. Pure and Applied Chem. 6, 168 (1963).
44. Michaelis, M. Persoonlijke mededelingen aan Surgenor (zie 22).
45. Ehrenberg, A., Laurell, C.B. Acta Chem. Scand. 9, 68 (1955).
46. Malmström, B., Vänngård, T., Aasa, R., Saltman, P. Fed. Proc. 22, 595 (1963).
47. a. Mulay, L.N., Selwood, P.W. J. Am. Chem. Soc. 76, 6207 (1954).
b. Mulay, L.N., Selwood, P.W. J. Am. Chem. Soc. 77, 2693 (1955).
48. a. Hedström, B.O.A. Ark. Kemi, 6, 1 (1953).
b. Gray, H.B. Record of Chem. Progress, 29, 163 (1968).
c. Schugar, H., Walling, C., Jones, R.B.,* Gray, H.B. J. Am. Chem. Soc. 89, 3712 (1967).
49. Rath, C.E., Finch, C.A. J. Clin. Invest. 28, 79 (1949).
50. Hanks, G.E., Cassell, M., Ray, R.N., Chaplin, H. J. Lab. Clin. Med. 56, 486 (1960).
51. Gaber, B.P., Aisen, P. B.B.A. 221, 228 (1970).

Naschrift.

De onderzoekingen in dit proefschrift vermeld werden verricht op de afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit te Rotterdam.

In het bijzonder ben ik U, Hooggeleerde Leynse, hooggeachte promotor, dank verschuldigd dat ik tijdens mijn opleiding tot klinisch-chemicus een proefschrift over de ijzerstofwisseling op Uw afdeling mocht bewerken.

Zeergeleerde van Eijk, ik dank U voor Uw steun bij de experimentele bewerking van dit proefschrift en tevens voor de accurate wijze waarop U het proefschrift als coreferent beoordeelde.

Hooggeleerde Soons, U dank ik voor het optreden als coreferent en de beoordeling van het proefschrift.

Weledelgeleerde Hellendoorn, het was voor mij een genoegen mijn opleiding tot klinisch-chemicus bij U aantevangen.

De heer J. Raaymakers steunde mij op enthousiaste wijze bij het uitvoeren van de vele experimenten.

De figuren werden door de audio-visuele dienst van de Medische Faculteit op nauwgezette wijze verzorgd.

Verder wil ik allen danken die mij in de afgelopen jaren bij dit onderzoek steunden.

Curriculum Vitae.

Op verzoek van de Medische Faculteit.

In 1962 werd het Staatsexamen HBS B afgelegd. Tot die datum was ik gedurende enige jaren werkzaam als chemisch analist. In genoemd jaar volgde inschrijving aan de Universiteit te Leiden met als studierichting scheikunde. Het candidaatsexamen in de scheikunde werd afgelegd in 1965, het doctoraalexamen in 1967 met als hoofdrichting Biochemie (Prof. Dr. L. Bosch) en bijvakken organische chemie en biofysica. In 1967 begon ik aan een opleiding tot klinisch-chemicus op het laboratorium van het R.K. Ziekenhuis te Groningen (Hoofd Drs. H. B. A. Hellen-doorn). Deze opleiding werd voortgezet en voltooid op het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt en de afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit te Rotterdam (Hoofd Prof. Dr. B. Leynse).